

**İNFERTİLİTE ÖN TANISI ALMIŞ NORMOSPERMİK KİŞİLERDE  
SPERM İZUMO-1 PROTEİNİN GÖSTERİLMESİ**



**Cansever MEDE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR**

**DÜZCE, 2023**

**T.C.**  
**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**İNFERTİLİTE ÖN TANISI ALMIŞ NORMOSPERMİK KİŞİLERDE**  
**SPERM İZUMO-1 PROTEİNİN GÖSTERİLMESİ**

Cansever MEDE tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Düzce Üniversitesi

---

**Jüri Üyeleri**

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Düzce Üniversitesi

---

Prof. Dr. Meryem ÇAM

İstanbul Arel Üniversitesi

---

Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU

Düzce Üniversitesi

---

Tez Savunma Tarihi: 22.09.2023

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

22.09.2023

Cansever MEDE

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Meryem ÇAM'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR'a da şükranlarımı sunarım. Tez konusuna karar verme sürecinde beni sınırlandırmayıp özgür bıraktığı ve bu süreçte beni teşvik edip görüşlerime değer verdiği için, tüm bilgi ve birikimiyle bana yol gösterdiği için kendisine çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımız boyunca kendisine yönelttiğim tüm sorularımı yoğunluğuna rağmen zaman ayırıp sabır ve hoşgörüsüyle cevapladığı için, bilgisinden faydalanmama izin verip bana ışık tuttuğu için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamız boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ali YAVUZCAN'a ve Doç. Dr. Üyesi Mehmet Ali SUNGUR'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca okul okumam için her türlü fedakarlığı yapıp, tüm zorluklara rağmen hem anne hem baba görevini üstlenen, beni bu günlere getiren değerli annem Ayfer AÇAR'a, uzaklardan beni hep izlediğini bildiğim ve gurur duyduğunu hissettiğim merhum canım babam Nedim AÇAR'a, aldığım tüm kararlarımda beni destekleyen, cesaretlendiren, hayatımdaki en büyük şansım sevgili eşim Ferman MEDE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2020.04.01.1117 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

22.09.2023

Cansever MEDE

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER.....	x
ÖZET .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	15
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
2.1. SEMEN HAZIRLAMASI VE AKROZOM REAKSİYONU .....	16
2.2. İZUMO-1 PROTEİNİN İMMUNOLOKALİZASYONUNUN İMMUNOFLORESAN İLE BELİRLENMESİ .....	18
2.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	19
3. GENEL BİLGİLER.....	20
3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ.....	20
3.2. TESTİS ANATOMİSİ .....	20
3.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ .....	23
3.3.1. Sertoli Hücreleri.....	24
3.3.2. İnterstisyel Doku .....	25
3.3.3. Leydig Hücreleri .....	25
3.3.4. Kan-Testis Bariyeri.....	26
3.3.5. Testis İçi Genital Kanallar .....	26
3.3.6 Spermatojeniz ve Spermiyogenez.....	27

3.3.6. Matür Spermin Yapısı .....	29
3.4. TESTİS FİZYOLOJİSİ .....	30
3.5. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ .....	31
3.6. İZUMO1 .....	34
3.7. ERKEK İNFERTİLİTESİ .....	37
3.7.1. Erkek İnfertilitesi Nedenleri .....	37
3.9. SİGARA KULLANIMININ ERKEK İNFERTİLİTESİNE ETKİSİ .....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	41
5. SONUÇ .....	52
6. KAYNAKLAR .....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	1

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 3.1. Erkek üreme sistemindeki yapıların şematik diyagramı.....	20
Şekil 3.2. Testis ve epididimisin H&E boyanmış kesiti.....	22
Şekil 3.3. İnsan testisinin midsagital kesiti.....	23
Şekil 3.4. Erkek genital sistemi bölümleri.....	24
Şekil 3.5. Seminifer tübül ve içerisinde yer alan hücrelerin görünüşü.....	29
Şekil 3.6. Spermiyogenez aşamasında spermatidlerin değişimi ve matür sperm yapısı.....	30
Şekil 3.7. Beş haftalık embriyonun TBF varlığında yedinci haftadaki testis gelişiminin görünümü.....	33
Şekil 3.8. Sperm- yumurta füzyonu sırasında juno ve izumo1 proteinin şematik Gösterimi.....	35
Şekil 3.9. Matür insan spermının baş kısmı.....	36
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait İzumo-1 immünfloresan boyama fotoğrafları.....	42
Şekil 4.2. Sigara içmeyen kontrol grubuna ait İzumo-1 ekspresyonunu gösteren fotoğraf.....	43
Şekil 4.3. Sigara içen kontrol grubuna ait İzumo-1 ekspresyonunu gösteren fotoğraf.....	44
Şekil 4.4. Hasta ve sigara içmeyen grupta İzumo-1 ekspresyonun gösteren fotoğraf....	45
Şekil 4.5. Hasta ve sigara içen grupta İzumo-1 ekspresyonun gösteren fotoğraf.....	46
Şekil 4.6. Sigara içen ve içmeyenlerde sperm izumo-1 protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.7. İdiopatik infertil hasta ve kontrol gruplarına ait sperm izumo-1 protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	48

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Çizelge 2.1. Dünya sağlık örgütü sperm parametreleri.....	17-18
Çizelge 3.1. Erkek infertilitesinin nedenleri ve risk faktörleri.....	38
Çizelge 4.1. İzumo-1 protein değerlerinin gruplar üzerindeki dağılım tablosu...	47



## KISALTMALAR

AA	Ön akrozom
AMP	Androjen bağlayıcı protein
AC	Akrozomal kap
AES	Apikal ekvatorial segment
AMH	Anti Mülleryen Hormon
AR	Akrozom reaksiyonu
BMP-4	Bone Morphogenic Protein
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
ES	Ekvator Segment
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GPI	Glikofosfatidilinositol
Hcg	İnsan koryonik gonadotropin
Hmg	İnsan menopozal gonadotropin
IAM	İç akrozomal zar
IVF	In vitro fertilizasyon
LH	Luteinizan hormon
OAM	Dış akrozomal zar
PA	Arka akrozom
PAR	Postakrozomal bölge
PM	Plazma zarı
Tssk6	Testis spesifik serin kinaz 6
WES	Tüm ekvatorial segment
WHO	World Health Organization
ZP	Zona pellisuda

## SİMGELER

cm	Santimetre
ml	militre
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre
KDa	Kilodalton



**ÖZET**  
**İNFERİLİTE ÖN TANISI ALMIŞ NORMOSPERMİK KİŞİLERDE**  
**SPERM İZUMO-1 PROTEİNİN GÖSTERİLMESİ**

Cansever MEDE  
Düzce Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Temmuz 2023, 59 sayfa

İnfertilite çağımızın önemli ve çok sık rastlanan problemlerinden biridir. Çiftlerin bir yıl korunmasız ilişki sonucu çocuk sahibi olamaması infertilite olarak nitelendirilir. İnfertilite vakalarının yaklaşık %50'sinin erkek faktörlü olduğu bilinmektedir. İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından toplumsal sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir ve her altı kişiden birinin infertil olduğu düşünülmektedir. Erkeklerde genetik anomaliler, sistemik hastalıklar, geçirilmiş enfeksiyonlar, varikosel, kanser ve kemoterapi gibi birçok neden infertiliteye sebep olmaktadır. Sağlıksız beslenme, alkol ve sigara kullanımı, ilaç kullanımı ve çevresel toksinlere maruz kalma gibi nedenler de kişilerde infertilite gelişiminde rol oynayan önemli risk faktörleridir. Erkek üreme sisteminde infertiliteye neden olan sebepler sperm parametrelerinde bozulmayla (sperm yokluğu, düşük sperm sayısı, anormal morfoloji ve düşük motilite) karakterizedir. Fakat bazı hasta gruplarında tüm bu parametreler normal olmasına karşın kişiler infertildir. Bu hasta grupları da idiyopatik infertil olarak isimlendirilir. İzumo1 memelilerde sperm-yumurta füzyonu için önemli sperm proteinlerinden biridir. Yapılan deneysel çalışmalarda erkek izumo1-/- bireyler normal sayıda hücre üretse de normal motilite ve morfoloji ile bu bireylerin tamamen infertil olduğu gösterilmiştir. Biz de bu çalışmayla infertilite ön tanısı almış normospermik kişilerin normal spermiyogram parametrelerine karşın bu kişilerde sigara kullanımına bağlı olarak sperm izumo1 proteininin seviyelerinde herhangi bir değişiklik olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Bu amaçla tez çalışmamız için infertil kişileri hasta olarak kabul edip, normospermik 100 kişiyi 4 gruba ayırdık.

1- Sigara içen hasta (30 kişi - infertil)

2-Sigara içmeyen hasta (30 kişi - infertil)

3-Sigara içen kontrol (20 kişi - fertil)

4-Sigara içmeyen kontrol (20 kişi - fertil)

Bu gruplardaki normospermik kişilerden sperm örnekleri toplandı ve immüno Floresan boyama yapılarak değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda hem hasta grubundaki sigara içenlerde hem de kontrol grubundaki sigara içenlerde sperm izumo-1 seviyelerinin sigara içmeyen hasta ve kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Bu çalışmayla, başka çalışmalarda sigara kullanımının sperm parametrelerinin bozulmasına yol açtığı gösterilmesine ek olarak sperm-oosit birleşmesi için gerekli sperm izumo-1 protein seviyelerinde azalma meydana getirerek infertilite oluşumu için bir risk faktörü oluşturduğunu göstermiş olduk.

**Anahtar Sözcükler:** İdiopatik, İnfertilite, İzumo-1, Sigara, Normospermi

**ABSTRACT**  
**DEMONSTRATION OF SPERM IZUMO-1 PROTEIN IN NORMOSPERMIC**  
**PERSONS WHICH DIAGNOSED WITH INFERTILITY**

Cansever MEDE

Düzce University

Department of Histology and Embryology

Master Thesis

Supervisor Asst. Prof. Kayıhan KARAÇOR

July 2023, 59 pages

Infertility is one of the most important and very common problems of our age. The inability of couples to have a child after one year of unprotected intercourse is considered infertility. It is known that approximately 50% of infertility cases are caused by the male factor. Infertility is recognized as a public health problem by the World Health Organization (WHO) and one out of every six people is thought to be infertile. Many reasons such as genetic anomalies, systemic diseases, previous infections, varicocele, cancer and chemotherapy can cause infertility in men. Reasons such as unhealthy diet, alcohol and cigarette use, drug use and exposure to environmental toxins are also important risk factors that play a role in the development of infertility in people. However in some patient groups, although all these parameters are normal, people are infertile. These patient groups are also called idiopathic infertile. Izumo1 is one of the important sperm proteins for sperm-egg fusion in mammals. In experimental studies, although male izumo1-/- individuals produce normal cell numbers, it has been shown that these individuals are completely infertile with normal motility and morphology. We aimed to determine if there were any changes.

For this purpose, for our thesis study, we considered infertile individuals as patients and divided 100 normospermic individuals into 4 equal groups.

- 1- Smoker patient (30 people - infertile)
- 2- Non-smoker (30 people - infertile)
- 3-Smoker control (20 people - fertile)
- 4-Non-smoker control (20 people - fertile)

Sperm samples were collected from normospermic individuals in these groups and evaluated by immunofluorescence staining. As a result of this evaluation, it was seen that sperm isumo-1 levels were significantly lower in both the smokers in the patient group and the smokers in the control group compared to the non-smoker and control groups. With this study, in addition to the other studies showing that smoking causes deterioration of sperm parameters, it is necessary for sperm-oocyte fusion. We have shown that by reducing sperm isumo-1 protein levels, it is a risk factor for the occurrence of infertility.

**Keywords:** Idiopathic, Infertility, Izumo-1, Smoking, Normospermia



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite sıklığı gittikçe artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. İnfertilitenin nedenleri arasında genetik ve sistemik hastalıklar, geçirilmiş enfeksiyonlar, kanser gibi birçok faktör bulunur. Yaşam şartları, sigara, alkol, radyasyon, kötü beslenme ve kimyasal maddeler de infertilitenin ortaya çıkmasında en belirgin risk faktörleridir. Bazı durumlarda infertilite nedenini açıklamak mümkün değildir ve bu durum idiyopatik infertilite olarak tanımlanır [1].

İzumo1 spermdeki en önemli sperm-yumurta füzyon proteindir[2, 3]. İzumo1 sperm-yumurta füzyonu için gerekli olan testise özgü bir moleküldür[4]. İzumo1 ve bunun yumurta tarafındaki reseptörü JUNO, membran füzyonunu tetiklemek için vazgeçilmez faktörler olarak ortaya konmuştur[5]. Transmembran sperm proteini İzumo1 füzyon için gereklidir ve sperm hücresinin başında bulunur. Bununla birlikte, İzumo1 olgun spermelerin plazma membranı üzerinde lokalize değildir[3, 6]. Spermatozoa, yumurtalarla kaynaşmadan önce, “kapasitasyon” olarak adlandırılan fizyolojik bir değişikliğe ve sperm membranlarının yeniden yapılandırılmasını ve “akrozom reaksiyonu” olarak adlandırılan akrozomal içeriğin salınmasını içeren bir sonraki morfolojik değişikliğe tabi tutulmalıdır[3, 7]. Akrozom reaksiyonundan (AR) sonra sperm plazma zarı üzerinde izumo1 bulunur[2, 3]. AR sırasında İzumo1 akrozomal kaptan (AC) başlayarak, tüm ekvator segmentine (WES) ve apikal ekvator segmentine (AES) ilerleyerek sperm başının tamamını kaplar. İzumo1'in yer değiştirmesi, aktin hücre iskeletine ve testise özgü serin kinaz 6'ya (Tssk6) bağlıdır[8, 9]. Tssk6, AR'den sonra aktin polimerizasyonunun düzenlenmesi yoluyla İzumo1'in yeniden dağıtılmasında rol oynar[8, 10].

Diğer sperm yüzey markerlarında olan bir kusur kesin olarak infertiliteye neden olmuyorken, İzumo1'deki bir kusur kesin olarak infertiliteye neden olmaktadır[10]. Yapılan bazı çalışmalarda sigara kullanımının sperm parametrelerinde bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle sigara kullanımı infertiliteye açısından idiyopatik risk faktörleri arasında yer almaktadır[1].

Biz bu çalışmayla sigara kullanımı ile sperm İzumo-1 proteini seviyeleri arasında bir ilişki olabileceğini düşündüğümüzden dolayı normospermik olup sigara içen idiyopatik infertil kişilerin floresan boyama yöntemleri ile sperm İzumo1 proteinin seviyelerini göstermeyi amaçladık.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamız, Düzce Üniversitesi İnsan Etik Kurulu'ndan 2020/44 no'lu karar ile onay alınarak (Bkz: Ek-1) Düzce Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yürütülmüştür. Ayrıca Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2020.04.01.1117 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmada kullanılacak olan insan sperm örnekleri, Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Androloji Laboratuvarına gelen idiopatik ve normospermik infertil bireylerden alınan örneklerle temin edildi.

Çalışmamızda 100 kişiden toplanan insan sperm örneği 4 gruba ayrılmıştır. İlk olarak gönüllülere çalışmamız hakkında olarak sözlü bilgilendirme yapılmıştır. Daha sonra bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılarak yazılı onamları alınmıştır. Normospermik idiopatik infertilite durumunda olanlar hasta olarak kabul edilmiştir.

1- Sigara içen hasta (30 kişi-infertil)

2-Sigara içmeyen hasta (30 kişi-infertil)

3-Sigara içen kontrol (20 kişi - fertil)

4-Sigara içmeyen kontrol (20 kişi - fertil)

Düzce Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarı'na başvuran hastalardan yukarıda verilen gruplardaki kriterlere göre 6 ay boyunca örnekler toplandı. Çalışmamız için hastalardan 2-3 günlük cinsel perhiz istenildi. Cinsel perhiz sonrası örnekler masturbasyon yolu ile elde edildi. Semen örnekleri titiz bir şekilde sürekli olarak isim, soy isim, tarih kontrolleri yapılarak ve steril plastik kaplar kullanılarak toplandı.

### 2.1. SEMEN HAZIRLAMASI VE AKROZOM REAKSİYONU

Semen örneklerinin kullanımı etik kurul insan araştırma komitesi tarafından onaylandı. Gönüllülerden semen örnekleri masturbasyon yoluyla androloji laboratuvarının örnek alma odasından alındı. Örneklerin oda sıcaklığında 1 saat içinde likefiye olması sağlandı. Her bir örnek Işık mikroskobu altında Makler sayım kamarasında 20x büyütmede incelenerek DSÖ'nün belirlediği sperm kriterlerine göre değerlendirildi[11]. Likefiye olan sperm örneği swim-up işleminden geçirilerek yıkama solüsyonuyla yüzdürme ve

yıkama işlemlerine tabi tutulup saflaştırıldı. Sperm örneklerini yayma amacıyla kullanılacak olan lamalar boyama işleminden 1 gün önce polilizin (Sigma; #25988-63-0) ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutulduktan sonra +4 °C’ de muhaza edildi.

Spermilerin akrozom reaksiyonlarını başlatmak amacıyla ilk olarak stok A23187 (Sigma, #A23187) (Calcimycin) hazırlandı. stok A23187 (Calcimycin) hazırlamak için 95,46 µl distile su çekildi ve mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Stok A23187(Calcimycin)’den 1 µl çekilip mikro santrifüj tüpüne eklendi ve vortekslendi.

Yıkanan sperm örneklerinden 192 µl çekilerek mikro santrifüj tüpü içerisine aktarıldı. Hazırlanan stok A23187 (Calcimycin)’den 8 µl çekildi ve sperm bulunan mikro santrifüj tüpüne eklenerek vortekslendi. Homojen olan örneğin üzeri 200 µl parafin yağı ile kaplandı ve 15 dakika boyunca 37<sup>0</sup>C sıcaklıktaki etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda bu sperm örnekleri polilizin ile kaplı lam üzerine 25 µl hacminde damlatılarak yayıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kurumasını tamamlayan sperm yaymaları %96’lık metanolde 10 dakika fikse edildi ve kurumaya bırakıldı. Aynı gün içinde boyanmayan örnekler boyama gününe kadar -20 °C’ de muhafaza edildi.

Çizelge 2.1. Dünya sağlık örgütü sperm parametreleri[11].

Parametre	Alt referans limiti
Semen hacmi (ml)	1,5 (1,4–1,7)
Toplam sperm sayısı (10 <sup>6</sup> /ejakülat)	39 (33–46)
Sperm konsantrasyonu (10 <sup>6</sup> /ml)	15 (12–16)
Toplam motilite (PR+NP, %)	40 (38–42)
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	32 (31–34)
Vitalite (canlı spermler, %)	58 (55–63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0–4,0)
Uzlaşılan diğer eşik değerler	

Çizelge 2.1 (Devamı). Dünya sağlık örgütü sperm parametreleri[11].

pH	$\geq 7,2$
Peroksidaz pozitif lökositler ( $10^6/ml$ )	$< 1,0$
MAR testi (partiküllere bağlı hareketli sperm, %)	$< 50$
İmmunobead test (boncukların bağlandığı hareketli sperm, %)	$< 50$
Seminal çinko ( $\mu mol/ejakülat$ )	$\geq 2,4$
Seminal fruktoz ( $\mu mol/ejakülat$ )	$\geq 13$
Seminal nötral glikozidaz (mU/ejakülat)	$\geq 20$

## 2.2. İZUMO-1 PROTEİNİN İMMUNOLOKALİZASYONUNUN İMMUNOFLORESAN İLE BELİRLENMESİ

Yukarıda belirtilen işlemlerden geçirilmiş ve akrozom reaksiyonunu tamamlamış sperm örneklerinde İzumo1 proteinin belirlemek amacıyla immünofloresan boyama işlemi yapıldı.

1.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmiş örnekler boyanmak üzere alındı.
2. Örnekler dik cam şale içerisinde bulunan PBS ile yıkandı. (2x5dk)
3. %0,1 triton-x (Bio basic 9002-93-1) PBS içerisinde çözdürüldü. (70 ml PBS, 70  $\mu$ l triton-x)
4. PBS içerisinden alınan örnekler triton-x çözeltisinde 10 dakika bekletildi.
5. 10 dakikalık süre tamamlandıktan sonra lamların sınırları hidrofobik kalemle belirlendi.
6. Örnekler nem kutusuna alındı ve UV blok (Thermo scientific #TA-125-UB) ile 5 dakika muamele edildi.

7. 1:200 oranında İzomo1 antikoru (Abcam, #ab211623) hazırlandı ve 6. aşama tamamlandıktan sonra örneklerin üzerine sınırlardan taşmayacak şekilde primer antikor damlatıldı.
8. Primer antikor damlatılan örnekler 1 saat nemli ortam kabında bekletildi.
9. 1 saat tamamlandıktan sonra lamaların üzerinde primer antikor döküldü ve lamalar 2x5 dakika PBS ile yıkandı.
10. 1:500 oranında seconder antikor (Jackson ImmunoResearch #111-095-003) hazırlandı. (Bu aşamadan itibaren karanlık çalışıldı.)
11. PBS'den alınan örnekler nemli ortam kabına yerleştirilerek sınırlardan taşmayacak şekilde seconder antikor damlatıldı ve 1 saat bekletildi.
12. 1 saat tamamlandıktan sonra örnekler nem kutusundan alınarak 3x5 dakika PBS ile yıkandı.
13. Örnekler yıkandıktan sonra kapama medyumu ile kapatıldı.

Bu işlemlerden sonra İmmünfloresan boyanan dokuların Olympus BX51 İmmünfloresan Mikroskobu kullanılarak fotoğrafları çekildi. Elde edilen bu fotoğraflar daha sonra İmage J programı kullanılarak değerlendirildi.

### **2.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

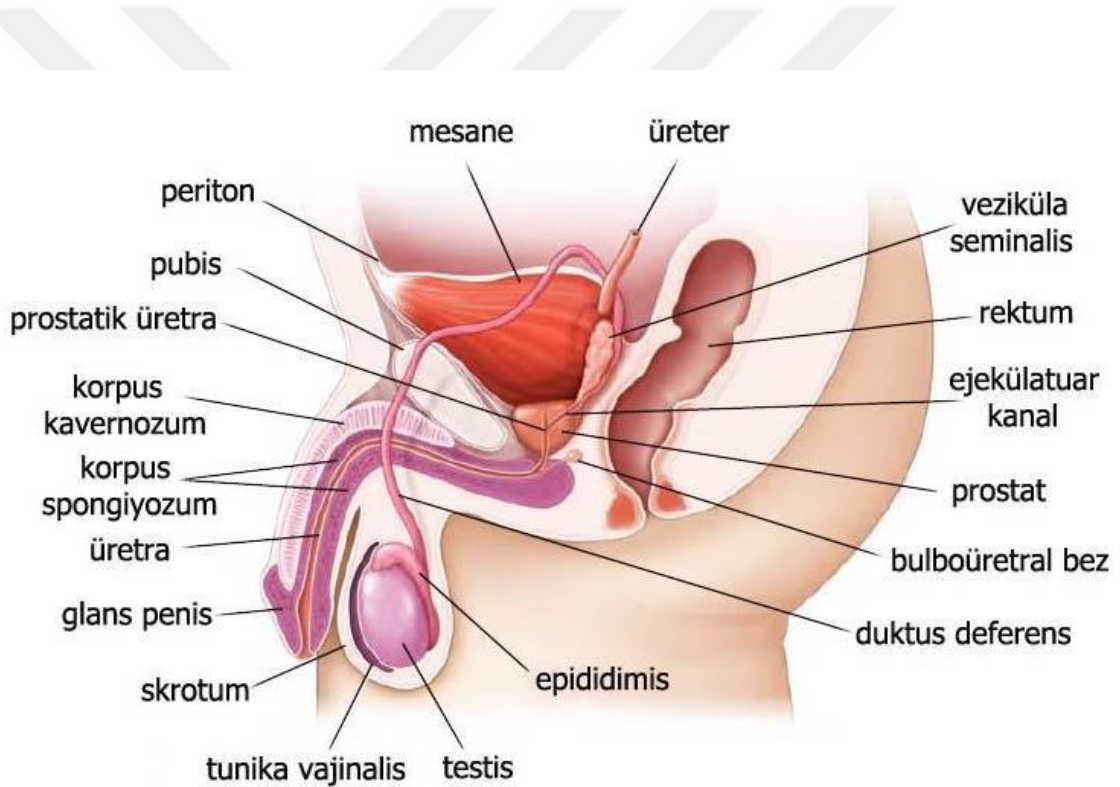
İmmünfloresan boyanan lamaların İmageJ programından elde edilen verilerinin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS v.22 programıyla yapıldı. Shapiro-Wilk testi kullanılarak verilerin dağılımı incelenmiş olup, İzumo-1 protein değerlerinin hasta-kontrol grupları ve sigara kullanımının birlikte etkisinin değerlendirilmesi için iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayısal değişkenler için ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek Üreme Sistemi; testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşur. Testislerin başlıca görevi spermatozoon ve erkek fizyolojisi için önemli olan androjenleri (özellikle testosteron) üretmektir. Testosteron spermatogenez, embriyonun erkek fetüs fenotipine gelişmesi ve gonodotropin salgısının kontrolünde önemlidir[12].

Genital kanallar ve yardımcı bezler ise testislerde üretilen spermatozoonların dışarıya doğru sürüklenmesi için gerekli olan salgıları üretir bununla birlikte bu salgılar spermatozoonların beslenmesinide sağlar. Bu kanallardaki salgılar ve spermatozoonlar penisten dışarı atılan semeni oluştururlar[12].



Şekil 3.1. Erkek üreme sistemindeki yapıların şematik diyagramı[13].

#### 3.2. TESTİS ANATOMİSİ

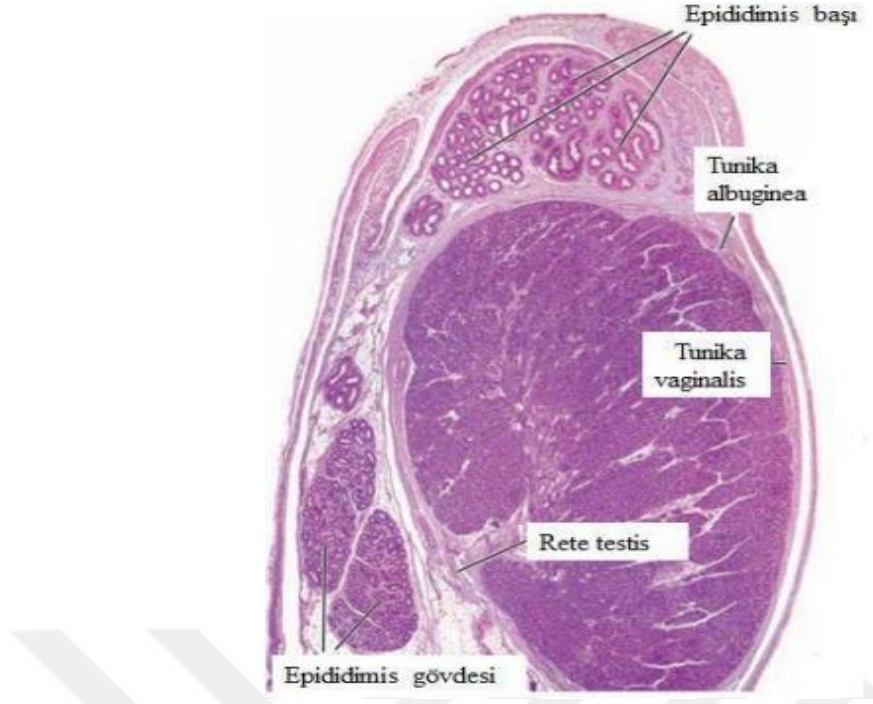
Testisler üst uyluklar arasında bir deri kesesi olan skrotumda bulunur. Skrotum içindeki sıcaklık, sperm üretimi için gerekli olan vücut sıcaklığından biraz daha düşüktür[14]. Erkek fetüste testisler böbreklerin yakınında gelişir ve doğumdan hemen önce skrotuma iner[14]. Bu iniş esnasında duktus deferens (vas deferens) gibi kanallar kendi damarlarını,

lenfatiklerini ve sinirlerini taşır. Bu sebepten testislerin lenf damarları para-aortik lenf nodlarına gider[15]. Kriptorşidizm, testislerin inmemesi durumudur ve testisler cerrahi olarak olması gereken bölgeye yerleştirilmedikçe bu durum infertilite ile sonuçlanır[14]. Her testis yaklaşık 3,8 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğindedir (4 cm'ye 2,5 cm) ve içten loblara bölünmüştür[14]. Her lob spermatogenezisin gerçekleştiği birkaç seminifer tübül içerir[14].

Testisler, spermatik kordlar tarafından skrotumda asılıdır ve sol testis genellikle sağ testisten daha aşağıda yer alır[16]. Her bir testisin yüzeyi, testisin epididim ve spermatik korda bağlandığı yer dışında, tunika vaginalisin visseral tabakası ile kaplıdır. Tunika vaginalis, embriyonik sürecin kapalı distal kısmını temsil eden testisi kısmen çevreleyen kapalı bir periton kesesidir[16]. İç kısmında visseral dışında pariyetal tabaka bulunur. Bu iki tabaka arasında seröz sıvı bulunur[17]. Tunika vaginalis'in visseral tabakası testis, epididimis ve duktus deferens'in alt kısmına yakından ilişkilidir. Tunika vaginalisin iç spermatik fasyaya bitişik olan pariyetal tabakası, visseral tabakadan daha geniştir ve spermatik kordun distal kısmına uzanır[16].

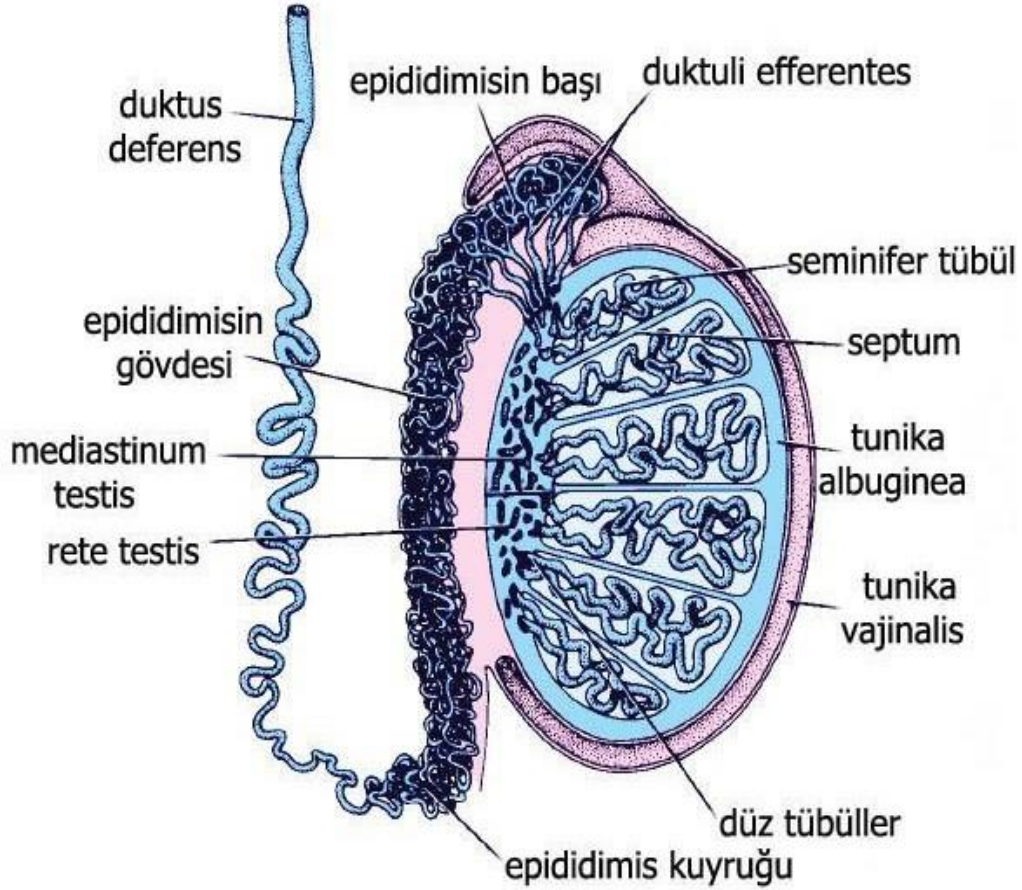
Tunika albuginea, testisin mediasteni olarak iç, arka yüzünde bir çıkıntı halinde kalınlaşır[16]. Bu iç çıkıntıdan, fibröz septalar spermlerin üretildiği seminifer tübüllerin arasında uzanır. Seminifer tübüller düz tübüller aracılığıyla rete testis ile birleşir. Tunika vasculosa, tunika albuginea'nın iç yüzeyinde yer alan tabakadır[16]. Damar ağ tabakası olan bu tabaka lobuli testisi sarar ve aynı zamanda tunika albuginea'nın tüm bölmelerinin yüzlerini örter[18].

Uzun testiküler arterler, abdominal aortun renal arterlerin hemen altındaki anterolateral yönünden çıkarlar[16]. Derin inguinal (kasık) halkalara ulaşmak için üreterleri ve eksternal iliak arterlerin alt kısımlarını geçerek retroperitoneal olarak (peritonun arkasından) eğik bir yönde ilerlerler. İnguinal kanalların derin halkalardan girip kanallardan geçip yüzeysel inguinal halkalarından çıkarlar ve testisleri beslemek için spermatik kordlara girerler. Testiküler arter veya dallarından biri duktus deferens arteri ile anastomoz yaparlar[16].



Şekil 3.2. Testis ve epididimisin H&E boyanmış kesiti[13].

Testis ve epididimisten çıkan damarlar, duktus deferens'in önünde uzanan ve spermatik korddaki testis arterini çevreleyen 8-12 damardan oluşan bir ağ olan pampiniform venöz pleksusu oluşturur[16]. Pampiniform pleksus, testisin termoregülatör sisteminin (kremasterik ve dartos kasları ile birlikte) bir parçasıdır ve testisleri sabit bir sıcaklıkta tutmaya yardımcı olur. Pampiniform pleksusun damarları üst üste birleşerek inferior vena kavaya giren bir sağ testis damarı ve sol renal damara giren bir sol testis damarı oluşturur[16]. Testisin lenfatik drenajı, testiküler arteri ve veni sağ ve sol lomber (kaval / aort) ve aort öncesi lenf düğümlerine kadar takip eder[16]. Testisin otonom sinirleri, omuriliğin T10(-T11) segmentinden sempatik lifler, visseral afferent lifler ve belki vagal parasempatik lifler içeren testiküler arterdeki sinirlerin testiküler pleksusu olarak ortaya çıkar. Otonom lifler aynı zamanda deferensiyal pleksus yoluyla testislere ulaşabilir[16].

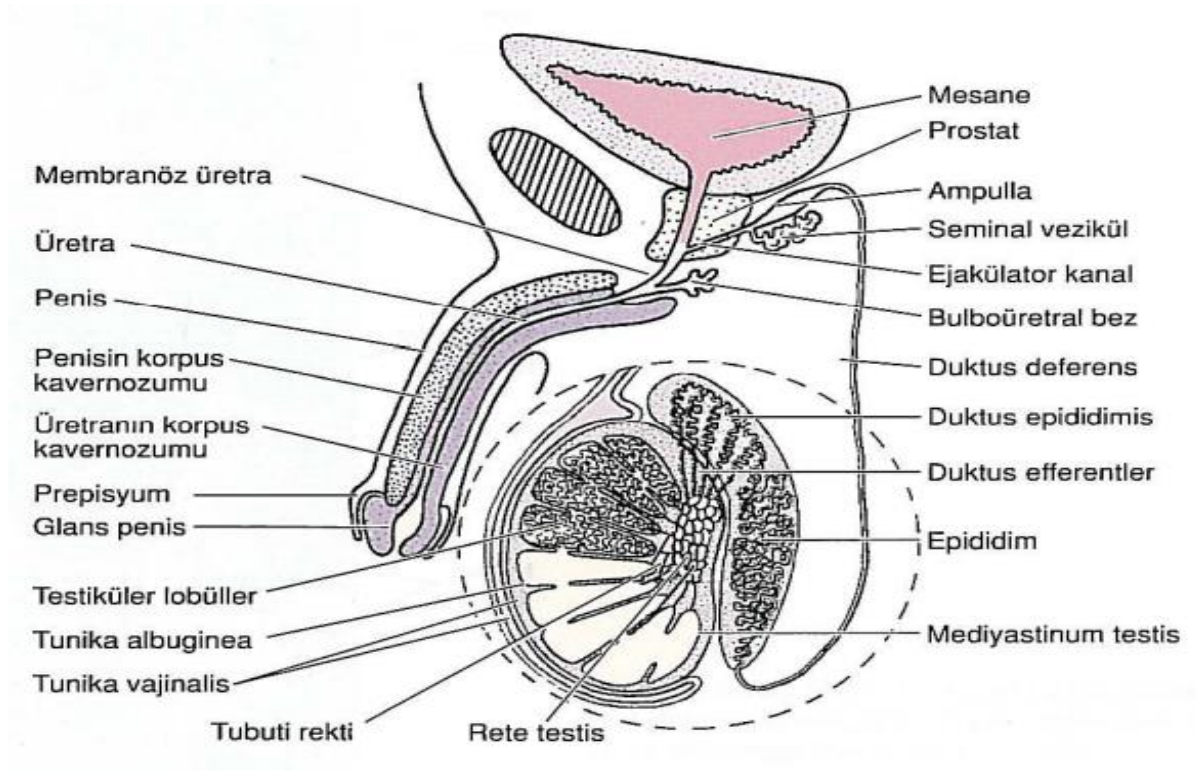


Şekil 3.3. İnsan testisinin midsagital kesiti[13].

### 3.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Embriyolojik gelişim sırasında her testis, kanal sisteminin ilk kısmı, kan damarları, lenfatikler ve sinirlerle birlikte periton boşluğunun arka duvarından skrotuma iner[19]. Bu göç sırasında, testis beraberinde bir periton tabakası taşır, böylece skrotumda testis neredeyse tamamen bir çift mezotel tabakası ile çevrelenir. Bu tabakaya tunica vaginalis denir ve plevra gibi ince bir seröz sıvı tabakası ile ayrılmış visseral ve parietal tabakalardan meydana gelir. Bu sıvı mezotelyal hücreler tarafından salgılanır ve bir kayganlaştırıcı görevi görerek testin skrotal kesede serbestçe hareket etmesini sağlar[19]. Tunica vaginalisin viseral tabakası, testisin kapsülü olan tunica albuginea üzerine oturur ve çok sayıda tamamlanmamış kollajen septaya yol açar. Bunlar testisi yaklaşık olarak 250 lobüle böler. Her bir lobül içinde, spermatozoanın üretildiği bir ila dört adet oldukça kıvrımlı olan seminifer tübüller vardır. Bu tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal epitelden meydana gelir[20]. Seminifer tübüller, rete testis adı verilen bir kanal pleksusuna açılır ve her biri 150-250  $\mu\text{m}$  çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır[12]. Seminifer tübüller spermatozoonları üretirler ve

tübüller arası bölgede yer alan leydig hücreleri testosteron salgırlarlar. Rete testisten, duktuli efferentes adı verilen 15 ila 20 küçük kanal, spermleri epididimis olarak isimlendirilen son derece kıvrımlı ilk kısmına taşır. Tubuli seminiferi contorti'nin duvar yapısı (seminifer epitel), sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere iki tip hücre içeren germinal doku ile döşenmiştir. Spermatogenik seri hücreleri denilen hücreler bazal lamina ile tübül lümeni arasında 4-8 sıralı tabaka halinde dizilmiştirler[19]. Bu hücreler bölünen, değişime uğrayan ve en sonunda olgun spermi oluşturacak olan spermatidleri içerir ve bu sürece spermatogenez adı verilir[12, 21]. Bu süreç yaklaşık olarak 70 gün sürer ve spermatozoanın nihai olgunlaşması epididimiste meydana gelir[19].



Şekil 3.4. Erkek genital sistemi bölümleri[9].

### 3.3.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, sitoplazmik uzantıları tight junction (sıkı bağlantılar) ile birbirlerine bağlanan piramidal hücrelerdir[19]. Bu hücreler, spermatogenik seri hücrelerini kuşatırlar. Tabanları bazal laminaya yerleşmiş durumdadır[19]. Apikal kısımları ise seminifer tübüllerin lümenine kadar uzamıştır. Bu hücelere ışık mikroskobu altında bakıldığında sınırlarını net bir şekilde gözlenemez[19]. Bunun nedeni sertoli hücrelerinin

spermatogenik seri hücrelerini saran çok sayıda lateral uzantılarının olmasıdır[19]. Bu hücrelerin gelişmiş bir endoplazmik retikulumları, fazlaca düz endoplazmik retikulumları, fazlaca mitokondriler, golgi aygıtları ve lizozomları bulunur. Sertoli hücreleri belirgin nukleoluslara sahiptirler. Hücrelerin çekirdekleri üçgen şeklinde uzamış durumdadır[19]. Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatozoonları destekler, besler ve aynı zamanda korurlar. Aynı zamanda tam olarak farklılaşıp gelişmemiş olan spermatogenetik hücreleri ortadan kaldırma yeteneğine sahiptirler[22]. Sertoli hücrelerinin başlıca görevleri,

- Gelişmekte olan spermatozoonları destekler, korur ve beslerler.
- Spermatidlerin olgunlaşması sırasında meydana gelen fazla sitoplazma kalıntılarını ortadan kaldırır.
- Kan- testis bariyerini oluştururlar.
- Fetal dönemde AMH (Anti Mülleryen Hormon) sentezi yaparlar.
- Spermatogenik hücreleri olgunlaştırmak üzere testiküler transferrini üretirler.
- Androjen bağlayıcı faktör salgırlarlar.
- Spermatogenezi ve spermiyogenezi düzenleyen faktörleri salgırlarlar.
- Leydig hücrelerinin ve peritübüler hücrelerin işlevini düzenleyen faktörleri salgırlarlar.
- Hormon üretimini düzenleyen inhibin hormonunu salgırlarlar.
- Tübüler sıvıyı salgırlarlar[19].

### **3.3.2. İnterstisyel Doku**

Testis dokusu seminifer tubüllerden (tubuli seminiferi) ve interstisyel dokudan meydana gelir. İnterstisyel doku, lenfatik kanalları, sinirleri, leydig hücrelerini ve kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan meydana gelir[19, 23, 24].

### **3.3.3. Leydig Hücreleri**

Leydig hücreleri interstisyel dokuda yer alan ve testosteron salgılayan ana hücrelerdir[19]. Tek tek veya kümeler halinde bulunurlar ve seminifer tubülleri çevreleyen zengin kan ve lenf kılcal pleksuslarında gömülü haldedirler. Hücrelerin çekirdekleri yuvarlaktır, dağınık kromatin ve periferde bir veya iki nukleolus bulunur[19]. Kapsamlı eozinofilik sitoplazma, değişken sayıda lipid damlacıkları içerir ve elektron mikroskobu ile incelendiğinde adrenal korteksin steroid salgılayan hücrelerine çok benzerler. Hücreleri fazlaca düz endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi aygıtı, lipid

damlacıkları ve lipofuksin granülleri bulunur[13, 25]. Leydig hücrelerinin testosteron üretmesi yaş artışına bağlı olarak azalır[26].

### **3.3.4. Kan-Testis Bariyeri**

Spermatogenez, sertoli hücrelerinin yapısal ve besleyici desteği ve endokrin faktörlerin hassas regülasyonu altında, memeli testisin fonksiyonel birimi olan seminifer tübüller içinde olgun spermatidlere dönüştüğü hücrenel süreçtir[27]. Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerin epitelinin tabanına yakın bir yerde, sahip oldukları sıkı bağlantılar ile kan-testis bariyerine meydana getirir[28]. Kan-testis bariyeri, testislerin normal fizyolojik işlevini sağlamak için besinleri spermatogenik tübüllere aktarır. Ayrıca biyolojik makromoleküllerin testis lümenine “giriş ve çıkışını” kısıtlar ve spermatogenez için eşsiz bir mikro ortam sağlar. Bu bariyer suyun, elektrolitlerin, iyonların, hormonların, parakrin faktörlerin ve diğer ekzojen biyomoleküllerin paraselüler ve transselüler difüzyonunu sınırlar, spermatogenez için benzersiz bir mikro ortam sağlar ve testislerin normal fizyolojik işlevine yardımcı olur[28, 29]. Kan-testis bariyeri seminifer tübülleri bazal ve apikal bölmelere ayırır. Mayoz, spermiyogenez ve spermiyasyon apikal bölmede gerçekleşir; bazal bölmede spermatogonyal hücre bölünmesi ve preleptoten spermatositlere farklılaşma meydana gelir. Böylece bu bariyer mayotik ve postmayotik germ hücrelerini kan dolaşımından ayıran immünolojik bir bariyer oluşturarak mayotik ve postmayotik germ hücreleri için benzersiz bir mikro ortam oluşturur[27]. Aynı zamanda bu bariyer seminifer tübüllere immünglobulinlerin geçişine engel olarak spermatogenik hücrelerin immün sistemden izole edilmesinde hayati rol oynar[30].

### **3.3.5. Testis İçi Genital Kanallar**

Tubuli rekti, rete testis ve duktuli eferentes testis içi kanallar olarak kabul edilir. Bu kanalların başlıca görevi spermatozoonları ve seminifer tübüllerden gelen sıvıyı duktus epididimise doğru taşımaktır[12].

#### **Tubuli Rekti**

Seminifer tübüller, testis lobüllerinin her birinin apeksine yakın bir yerde birleşerek tubuli recti adı verilen kısa, düz tübüller oluşturur. Epitelinde sertoli hücreleri bulunurken germ hücreleri yer almaz. Epiteli ince bir bazal lamina üzerinde uzanır ve gevşek bağ dokusu ile çevrilidir. Tubuli rektinin lümeni, mediastunumda bir anastomozlaşan kanallar ağı olan rete testis ile devamlılık gösterir[31].

## **Rete Testis**

Rete testis, her birinin apikal yüzeyinde mikrovilluslar bulunan ve tek bir silyum taşıyan hücrelerden meydana gelen prizmatik epitel ile kaplı olan kanallar sistemidir. Epiteli hassas bir bazal limana üzerinde yer alır[31].

## **Duktuli Efferentes**

Erkeklerde testisin posterosüperior yüzeyindeki mediastenden 10 ila 15 duktuli efferentes ortaya çıkar ve rete testis kanallarını duktus epididimis ile birleştirir. Efferent kanallar kıvrımlı bir seyir izler ve destekleyici dokuları ile epididim başının başlangıç segmentini oluşturur[31]. Efferent kanalların lümen sınırı, değişen uzun ve kısa sütunlu hücre gruplarının varlığından dolayı karakteristik düzensiz bir şekil gösterir. Epiteli siyalı ve silyasız hücrelerden meydana gelir. Silyasız hücreler, apikal yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus gösterir ve duktal sistemin bu bölümünde bulunan testis sıvısının çoğunu emdiği düşünülür. Siyalı hücreler ise epididimise doğru ilerler ve hareketsiz spermi ve testis sıvısını bu yönde hareket ettirmeye yardımcı olur.[31] Epiteli bir bazal lamina üzerinde yer alır ve epididimis kanalına doğru kalınlaşan dairesel olarak düzenlenmiş bir düz kas tabakası ile sınırlıdır[31].

### **3.3.6 Spermatogenez ve Spermiyogenez**

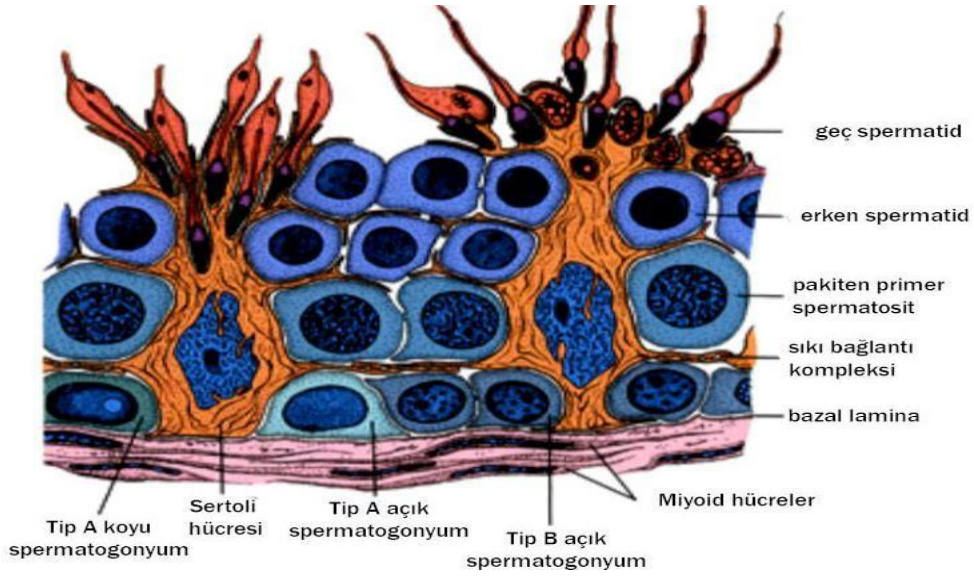
Seminifer tübülde sperm üretiminin birinci aşaması spermatozoon üretim sürecidir ve bu süreç spermatogenez olarak isimlendirilirken ikinci aşama ise spermiyogenez olarak isimlendirilir[12].

Spermatogenez, spermatogonyumların spermatozoon halini alması sürecidir. Spermatogonyumlar bazal laminaya bitişik olan germinal epitelin bazal bölümünde bulunur. Hücreler 10 ile 20  $\mu\text{m}$  çapında olup yuvarlak veya elips şeklinde, diploid kromozom sayısına sahiptirler. Spermatogonyum, yaklaşık olarak 12  $\mu\text{m}$  çapında ve bazal laminanın hemen üstünde bulunan küçük bir hücredir. İki tip spermatogonyum ayırt edilebilir. A tipi spermatogonyumlar, mitoz ile çoğalır ve gelecekteki germ hücrelerinin oluşumu için bir kök hücre rezervi sağlar. Mitotik bölünmeler ile A tipi spermatogonyumlar, B tipi spermatogonyumları oluşturur. Bu iki tip spermatogonyum hücreleri çekirdeklerine göre ayırt edilebilir. Tip A spermatogonyum küresel veya eliptik çekirdeğe sahipken, B tipi spermatogonyum daha açık renkli küresel çekirdeğe sahiptir[31].

Primer spermatositler ilk başta B tipi spermatogonyumlara benzerler, ancak germinal epitelin bazal laminasından göç ettikçe daha büyük ve daha küresel hale gelip çekirdek bölünmenin ilk aşamalarına girer[31]. Primer spermatositler genellikle germinal epitelin merkezinde yer alırlar ve bu büyük hücrelerin bazalden adluminal bölmeye nasıl geçtiği bilinmemektedir[31]. Primer spermatosit, sekonder spermatositleri üretmek için birinci mayoz bölünmeye uğrarlar. Primer spermatosit birinci mayozun profaz safhası yaklaşık 22 gün sürdüğünden, yapılan mikroskopik incelemelerde görülen spermatositlerin çoğu bu hücrelerdir. Birinci mayozun tamamlanmasıyla sekonder spermatositler meydana gelir ve bu hücreler haploit kromozom sayısına sahiptirler. Bu hücreler oluştuktan hemen sonra bölünmeye girdiğinden, mikroskopik incelemelerde çok nadir görülürler[31]. Sekonder spermatositlerin mayoz bölünmesiyle haploit kromozom içeren spermatidler meydana gelir. Spermatositlerin mayoz 1 ve mayoz 2 bölünmelerinin arasında interfaz evresinde S fazı görülmez. Bu durum oluşan hücrelerin haploid kromozom sayısına sahip olmalarına neden olur[12].

Spermatidlerin ince, hareketli spermlere farklılaşma sürecine spermiyogenez denir[31]. Meydana gelen spermatidler, merkezi küresel çekirdekli, belirgin golgi aygıtı, çok sayıda mitokondri içeren yuvarlak hücrelerdir. Spermiyogenezin başlangıcında, Golgi zarlarında birçok küçük granül belirir ve bu granüller akrozomu meydana getirmek için için tek bir yapı oluşturmak üzere birleşir[31]. Gelişmekte olan akrozom, golgi aygıtından türetilen akrozomal vezikül olan bir zarla çevrilidir ve nüklear zarfın dış tabakası ile yakından ilişkilidir. Akrozomal vezikül genişler ve daha sonra çekirdeğin ön yarısının üzerine çökerek akrozomal kabı oluşturur. Bu olaylar meydana gelirken, iki sentriyol, oluşan akrozomun zıt tarafında, çekirdeğe yakın bir konuma göç eder. Distal sentriyolden dokuz periferik çift ve merkezi bir çift mikrotübül gelişir ve kuyruğun aksonemini oluşturmaya başlar. Proksimal sentriyol, çekirdeğin implantasyon fossa adı verilen kaudal bölgesi ile yakından ilişkili hale gelir. Aksonem gelişmeye devam ettikçe, etrafına dokuz uzunlamasına kaba lif uzanır ve çekirdeği (başı) spermatozoonun kuyruğu ile birleştiren bağlantı parçasını oluşturan dokuz kısa, parçalı sütun ile karışır[31]. Annulus sentriyollerin yakınında oluşur ve gelişmekte olan kamçıdan aşağı doğru göç eder. Rastgele dağılmış mitokondri kamçıya göç eder ve sentriyoller ile annulus arasındaki sıkı bir sarmalda hizalanır. Bu spiral olarak düzenlenmiş mitokondriyal kılıf, olgun bir spermatozoanın kuyruğunun orta parçasını karakterize eder. Bu olaylarla eş zamanlı olarak çekirdekte belirgin değişiklikler meydana gelir: yoğunlaşır, uzar ve hafifçe

düzleşir ve akrozomla birlikte sperm başını oluşturur. Sitoplazmanın büyük kısmı artık gelişen spermatidin orta parçası ile ilişkilidir. Farklılaşma tamamlanmak üzereyken, fazla sitoplazma artık gövde olarak dökülür ve spermatozoonu kaplamak için yalnızca ince bir sitoplazma tabakası bırakılır. Kalıntı sitoplazma, spermatozoa seminifer tübülün lümenine salınır ve sertoli hücreleri tarafından fagositize edilir. Spermatozoalar bu aşamada morfolojik olarak olgun görünse de, hareketsizdirler ve fertilizasyon yeteneğine sahip değildir[31]. Spermatogonyumun spermatozoaya dönüşmesi için geçen süre nispeten sabittir ve türe özgüdür: insanlarda yaklaşık 64-70 gündür[31].

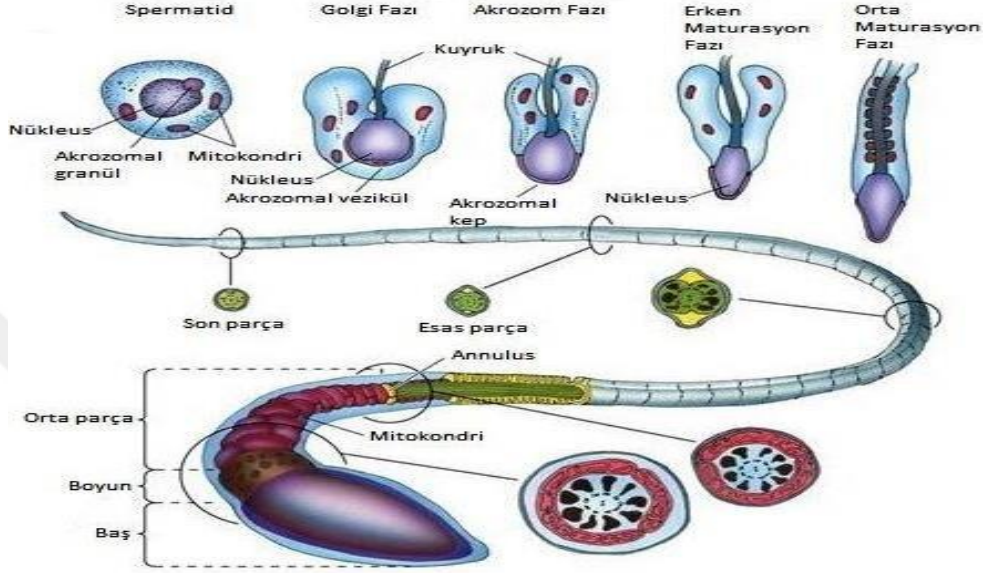


Şekil 3.5. Seminifer tübül ve içerisinde yer alan hücrelerin görünüşü[13].

### 3.3.6. Matür Spermin Yapısı

Seminifer tübüllerin lümeninde serbest halde bulunan spermatozoa, çekirdek içeren bir baş ve hücreye hareketlilik sağlayan bir kuyruktan oluşur. Çekirdeğin kromatini çok yoğunlaşmıştır ve hacmi azalmıştır, bu durum işlevsel olarak olgun spermlere daha fazla hareketlilik sağlar[31]. Yoğunlaştırılmış kromatin formu, spermatozoan yumurtayı dölleme yolundayken genomu da korur. Akrozomal kap, çekirdeğin ön üçte ikisini kaplar ve fertilizasyon sırasında yumurtanın penetrasyonu için önemli olan enzimleri içerir[31]. Çekirdeğin boyutu ve şekli farklı türlerde çok büyük farklılıklar gösterir. Sperm kuyruğu yaklaşık 55 µm uzunluğundadır ve boyun, orta parça, ana parça ve son parçadan meydana gelir. Spermin boyun kısmı baş ve kuyruğun birleştiği bölgede yer alır. Orta parça boyundan halkaya kadar uzanır ve aksonem, dokuz kalın lif ve mitokondri sarmal kılıfından oluşur[31]. Ana parça kuyruğun en uzun kısmıdır ve aksonem ile çevresel

liflerden oluşan bir kılıfla çevrili dokuz kalın liften (2 + 9 + 9 düzenlemesi) oluşur[31]. Son parça, kuyruğun en kısa bölümüdür ve plazmalemma ile çevrili aksonemden meydana gelir. Fizyolojik olgunlaşmanın son adımı dişi üreme organında gerçekleşir ve bu duruma kapasitasyon denir. Bu olay yumurta kanalında meydana gelir[31].



Şekil 3.6. Spermiyogenez aşamasında spermatidlerin değişimi ve matür sperm yapısı[20].

### 3.4. TESTİS FİZYOLOJİSİ

Testisler spermatozoa ve testosteron gibi hormonları üretme özelliğine sahiptirler[12]. Testisler, duvarlarında spermatozoanın ilkel germ hücrelerinden (spermatogenez) oluşturulduğu kıvrımlı seminifer tübüllerden oluşur. Lobların her birinin ucu mediastende bulunan rete testis denen bir kanal ağına akar. Oradan Duktuli eferentesler ve epididimise ulaşır. Burada motilite kazanır ve ejakülasyon sırasında vas deferense geçer. Ejakülasyon sırasında spermatozolar, prostatın gövdesindeki üretraya ejakülasyon kanalları yoluyla girerler.

Vücut sıcaklığından (37 °C) düşük ısıda gerçekleşen spermatogenez için ısı oldukça önemlidir[12]. Testisin ekzokrin salgısı seminifer tübüllerin aktif holokrin salgısı olan spermatozonlardır[32]. Bu nedenle skrotum sıcaklığı vücut sıcaklığından yaklaşık 3-4 °C daha düşüktür. Pampiniform pleksus, testisin termoregülatör sisteminin (kremasterik ve dartos kasları ile birlikte) bir parçasıdır ve testisleri sabit bir sıcaklıkta tutmaya

yardımcı olur. Aynı zamanda skrotum terinin buharlaşması, spermatik kordonda yer alan kramester kasların kasılması spermatogenezin gerekli ısısını sağlamada etkilidir[33].

İnterstisyumda bulunan leyding hücreleri testosteron salgırlar. Testosteron sperm üretimi sürecinde germ hücrelerinin bölünüp farklılaşması için gerekli olup, hipofiz bezinden salgılan Luteinizan hormon (LH) etkisiyle leydig hücrelerinden salgılanır[34]. Aynı zamanda testosteron, spermatogenez ve erkek üreme sisteminde bezlerin (prostat ve vesikula seminalis) fonksiyonlarını devam ettirmektedir[35]. Leydig hücreleri testosteron, dihidrotestosteron ve östradiol üretir ve ayrıca LH, somatotropin (STH), folikül stimüle edici hormon (FSH), büyüme hormonu (GH), prolaktin, östrojen, human chorionic gonadotropinin (HcG)'nin etkileriyle uyarılır[34, 36]. FSH' da LH gibi spermatogenez için önemli hormonlardan biridir. FSH, sertoli hücrelerine etki ederek ABP'nin sentezini ve salınımını uyarır. Salınan ABP, testostere bağlanarak bu hormonun seminifer tübül lümenine kadar taşınmasına yardımcı olur. Spermatogenez östrojen ve progesteron tarafından inhibe edilir. Spermatozoonlar, sertoli hücreleri ve rete testiste bulunan hücreler tarafından salgılanan testiküler sıvı ile epididimis içine taşınır. Testiküler sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içermektedir[37].

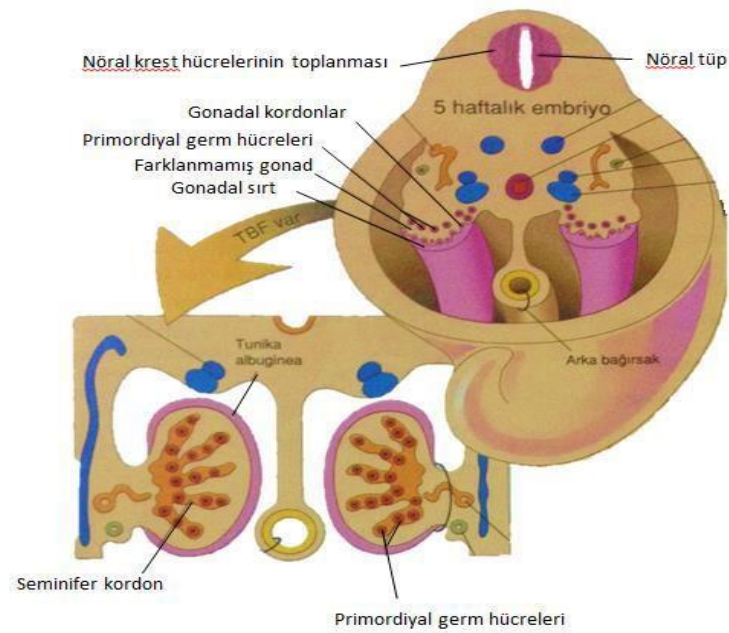
### **3.5. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ**

Hem erkeklerde hem de dişilerde gamet oluşturan hücreler yolk kesesi adı verilen ekstraembriyonik bir zar içinde gebeliğin dördüncü haftasında tespit edilebilir[38]. Bu hücreler primordiyal germ hücreleri olarak isimlendirilir. Gelişimin 4. ve 6. haftasında bu primordiyal germ hücreleri yolk kesesinden bağırsak tüpünün duvarına oradan da bağırsak mezenterinden sırt vücut duvarına ameboid hareketlerle ilerler[38]. Bu hücreler dorsal vücut duvarında, orta hattın her iki tarafında, kölomik boşluğun membranöz duvarının hemen derinindeki gevşek mezenkimal dokuda dururlar. Primordiyal germ hücreleri, göçler esnasında mitoz bölünmeler ile çoğalmaya devam ederler. Bu hücrelerden bazıları göç esnasında mahsur kalarak ekstragonadal bölgelerde dinlenmeye başlayabilirler ve bu hücreler teratom adı verilen bir çeşit tümöre yol açabilirler[38].

Erkek genital sisteminin gelişiminde ilk olay, Y kromozomunda bulunan SRY geninin ekspresyonudur[38]. Bu faktörün etkisi altında somatik destek hücreleri sertoli hücrelerine farklılaşmaya başlar ve germ hücrelerini sararlar. Gelişimin 7. haftasında farklılaşan sertoli hücreleri gonadın interstisyel hücreleri ile birlikte, germ hücrelerini bu

kordonların merkezine germ hücrelerini hapsederek testis kordonları oluşturmak üzere organize olurlar. Testis kordonları ergenlikte kanalize olur ve bir seminifer tübül sistemine farklılaşır. Sertoli hücreleri, mezonefroza bitişik ve germ hücrelerinden yoksun bölgede, rete testis adı verilen bir dizi ince duvarlı kanal şeklinde organize olurlar. Seminifer tübülleri sınırlı sayıda mezonefrik tübülle (gelecekteki efferent kanallar) bağlayan rete testis, ergenlik döneminde kanalize olur ve seminifer tübülleri mezonefrik kanallara bağlayan bir kanal oluşturur[38]. Mezonefrik kanallar daha sonra epididim, spermatik kanallar veya vas deferens ve erkekte seminal veziküllere (daha sonra örtülür) dönüşür. Gelişimin 7. haftasında, testisler mezonefroz ile temas alanlarını azaltarak yuvarlaklaşmaya başlar. Testisler gelişmeye devam ederken, kölom epiteli testis kordlarından tunica albuginea adı verilen bir bağ dokusu tabakası ile ayrılır[38]. Germ hücrelerinin daha fazla gelişmesi, doğum sonrası yaklaşık üç aya kadar, A tipi spermatogoniye farklılaşana kadar gerçekleşmez. Erkek gametogenezinin kalan evreleri (daha ileri mitoz, B tipi spermatogonyuma farklılaşma, mayoz ve spermatogenez ) ergenliğe kadar ertelenir. Sertoli öncesi hücreler morfolojik farklılaşmalarına başladıkça buna karşılık, Anti Mülleryen Hormonu (AMH) adı verilen bir glikoprotein hormonu salgılamaya da başlar. AMH, Tgf $\beta$  ailesinin bir üyesidir ve özellikle insanlarda yaklaşık 8. haftadan başlayarak sertoli hücreleri tarafından eksprese edilir ve paramesonefrik kanalların 8. ve 10. haftalar arasında hızla gerilemesine neden olur[38]. Gelişimin 9. veya 10. haftasında, sertoli öncesi hücreler tarafından toplanan mezenkimal hücrelerden leydig hücreleri farklılaşır. Bu hücreler testosteron hormonu salgırlar. Gelişimin bu erken aşamasında testosteron salgılanması, plasenta tarafından salgılanan peptid hormon koryonik gonadotropin tarafından düzenlenir. Gelişimin ilerleyen aşamalarında, erkek fetüsün hipofiz gonadotropinleri, seks steroidlerinin (androjenler) sentezlenmesinin kontrolünü ele geçirir. Plasental koryonik gonadotropinin kontrolü altında, hem leydig hücre sayısı hem de testosteron seviyeleri gebeliğin 14 ila 18 haftasında zirveye ulaşır[38]. Leydig hücreleri üzerindeki lüteinize edici hormon reseptörleri 12. haftada ortaya çıkmaya başlar. Bu sırada bu hücreler tarafından salınan steroidojenik enzimlerin ekspresyonunda eş zamanlı bir artış olur. Fakat 16. haftadan gonadotropin kontrolü hipofize geçerken leydig hücrelerinin sayısı ve steroidojenik enzimlerin seviyeleri düşmeye başlar. Gelişimin 8. ve 12. haftası arasında testosteron, mezonefrik kanalları uyararak testisleri üretraya bağlayan bir organlar sistemine (epididimis, vas deferens ve seminal vezikül) dönüşmesi için uyarır. Mezonefrik kanalın büyük kısmı vas deferens adı

verilen spermatik kanala farklılaşır. Her mezonefrik kanalın en kraniyal ucu dejenere olarak apendiks epididimis adı verilen küçük bir kalıntı bırakır ve mezonefrik kanalın varsayımsal testise bitişik bölgesi kıvrımlı epididimise farklılaşır. Dokuzuncu hafta boyunca, epididim bölgesindeki 5 ile 12 mezonefrik tübül, gelecekteki rete testisin kordonlarıyla temas eder[38]. Epigenital mezonefrik tübüller bundan sonra efferent kanallar olarak adlandırılır ve seminifer tübüllerden ve rete testisten epididimise bir kanal sağlarlar. Bu arada, gelişmekte olan testisin kaudal kutbundaki mezonefrik tübüller (paragenital mezonefrik tübüller olarak adlandırılır) dejenere olur ve paradidim adı verilen küçük bir kalıntı bırakır[38]. Genital sistemde yer alan seminal vezikül, prostat ve burbourethral bez mezonefrik kanallar ve üretra arasındaki bağlantı yakınında gelişir. Gelişimin 10. haftasında glandüler seminal veziküller, üretraya bağlanmalarının yakınındaki mezonefrik kanallardan filizlenir. Prostat bezi de üretradan tomurcuklanan bir endodermal evajinasyon kümesi olarak 10. haftada gelişmeye başlar[38]. Prostatın endodermal olarak türetilmiş glandüler kısmını çevreleyen mezenkim, prostatın düz kasına ve bağ dokusuna farklılaşır. Prostat gelişmeye devam ederken bulboüretal bezler ( Cowper bezleri), prostatın hemen altında üretradan filizlenir. Endodermal glandüler dokuyu çevreleyen mezenşim, prostatta olduğu gibi bu bezin bağ dokusu ve düz kasını oluşturur. Fetal dönemin 26. Haftasından itibaren testisler skrotuma inmeye başlar. Sonunda, seminal veziküllerin, prostatın ve bulboüretal bezlerin salgılarının tümü, ejakülasyondan sonra spermatozoayı koruyan ve besleyen seminal sıvıya katkıda bulunur[38].



Şekil 3.7. Beş haftalık embriyonun yedinci haftadaki testis gelişimin görünümü[39].

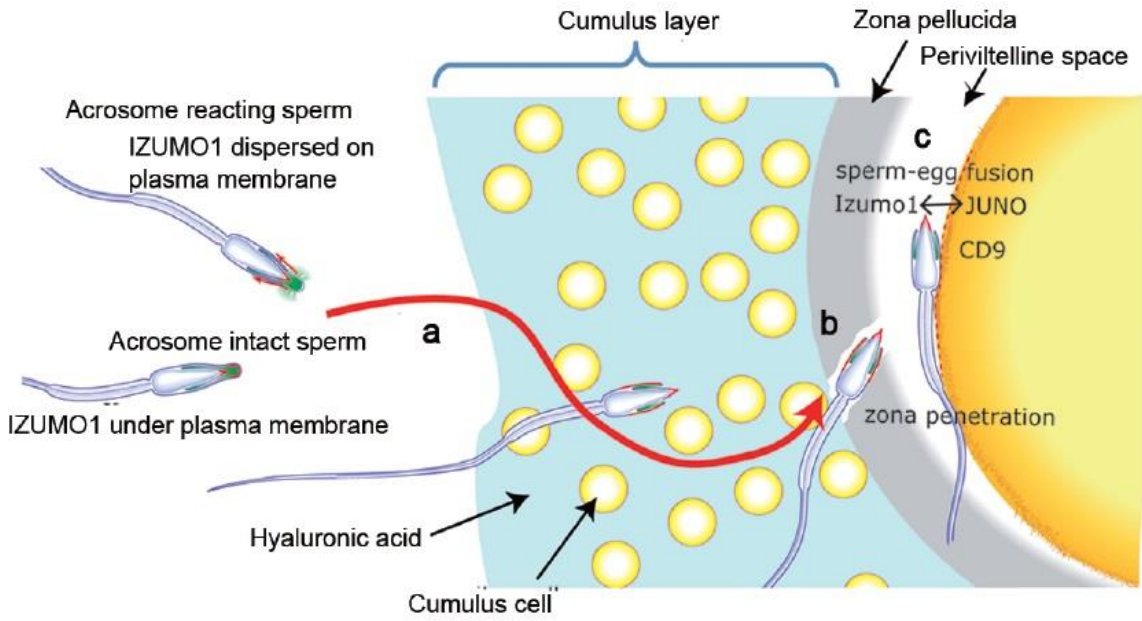
### 3.6. İZUMO1

İzumo1, kısa bir sitoplazmik kuyruğu olan transmembran proteinidir[6, 10]. İzumo1, sperm-yumurta füzyonu için gerekli olan yaklaşık 56 kDa'lık testis'e özgü bir moleküldür[2, 4]. İzumo1 spermdeki en önemli sperm-yumurta füzyon proteinidir ve füzyon için gereklidir. İzumo1 proteininin disfonksiyonu veya mutasyonu erkek infertilitesine neden olabilir[40]. Fertilizasyon, sperm ve oositin birbirlerini bulduğu ve etkileşime girdiği olaydır. Bununla birlikte, fertilizasyonda İzumo1'in fonksiyonu olup olmadığı sorusu, İzumo1'den yoksun fareler homolog rekombinasyon ile üretilinceye kadar kesin olarak cevaplanamamıştır. İzumo1 mutant fareler üretildikten sonra sağlıklı oldukları ve belirgin gelişimsel anomalileri olmadığı gösterilmiştir. Beklendiği gibi, İzumo1<sup>-/-</sup> erkekleri normal çiftleşme davranışına rağmen infertil oldukları saptanmıştır[41]. İzumo1<sup>-/-</sup> bireylerde sperm ZP'ye sorunsuz bir şekilde nüfuz eder ancak yumurtalarla kaynaşmaz. Bu durum yumurtaların perivitellin boşluğunda sperm birikmesine neden olur[2, 41]. Spermin ZP'ye nüfuz edip perivitellin alana birikmesi, izumo1'in füzyon için anahtar rol oynadığının göstergesidir[2]. Kesintisiz devam eden genetik çalışmaları, İzumo1'in fertilizasyon için gerekli olduğunu açıkça göstermiştir[42]. Erkek İzumo1<sup>-/-</sup> gametleri normal sperm hücre sayıları üretse de, normal motilite ve morfoloji ile bu hayvanlar tamamen infertildir[42]. Erkek İzumo1 infertilitesinin nedenleri ile ilgili daha fazla araştırma, İzumo1<sup>-/-</sup> gametlerinin yumurta ile kaynaşmalarında tamamen başarısız olduğunu göstermiştir. Bu veriler, İzumo1'in sperm yumurta füzyonunda rol oynadığına dair kesin kanıtlar sağlamıştır[2].

İzumo1'in yumurta içinde neye bağlandığının tam olarak anlaşılması, son zamanlarda bir dizi düşük afiniteli bağlanma çalışması ile geliştirilmiştir. "Juno" olarak adlandırılan yumurta üzerinde bulunan GPI (glikofosfatidilinositol) bağlantılı hücre yüzeyi reseptörünün, İzumo1 bağlayıcı bir glikoprotein olduğu keşfedilmiştir. İzumo1 ve Juno genleri tarafından kodlanan proteinler, sperm ve yumurtanın tanınmasında rol oynayan bir ligand-reseptör protein çifti oluşturur[43]. Gerçekten de Juno nakavt fareleri, spermatozoanın yumurta ile kaynaşmamasından dolayı infertildir. İzumo1 ve bunun yumurta tarafındaki reseptörü Juno, membran füzyonunu tetiklemek için vazgeçilmez faktörler olarak ortaya konmuştur[2, 5].

Daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi, izumo1'deki bir kusurun erkek infertilitesine neden olduğu saptanmıştır[10]. Bununla birlikte izumo1, olgun spermlerin

plazma membranı üzerinde lokalize değildir[10]. Spermatozoa, yumurtalarla kaynaşmadan önce, “kapasitasyon” olarak adlandırılan fizyolojik bir değişikliğe ve sperm membranlarının yeniden yapılandırılmasını ve “akrozom reaksiyonu” olarak adlandırılan akrozomal içeriğin salınmasını içeren bir sonraki morfolojik değişikliğe tabi tutulmalıdır[6, 7]. Akrozom sperm başının ön yarısında bulunur ve ön akrozom (AA), arka akrozom (PA) veya ekvator segmenti (ES) olarak alt bölümlere ayrılır. Başın arka kısmına postakrozomal bölge (PAR) denir[10]. Spermin baş kısmı dıştan içe doğru dört membran ile çevrilir; plazma membranı (PM), dış akrozomal membran (OAM), iç akrozomal membran (IAM) ve nükleer zar[10].

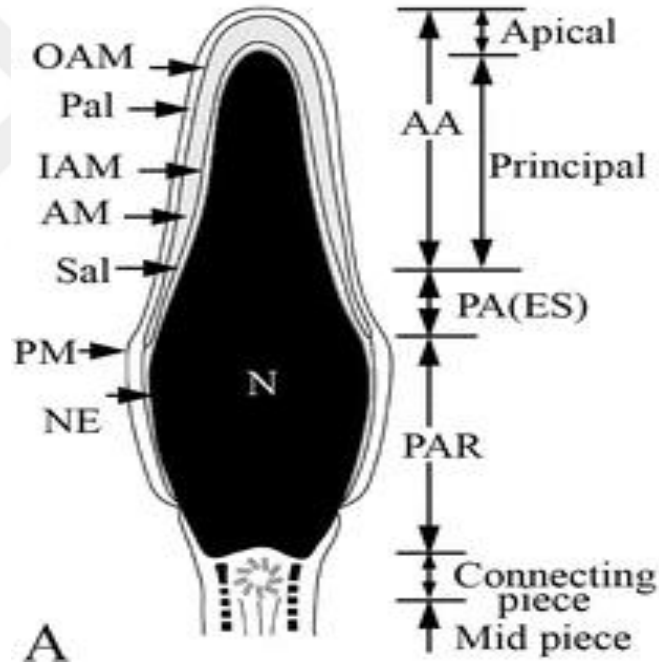


Şekil 3.8. Sperm- yumurta füzyonu sırasında Juno ve İzumo1 proteininin şematik gösterimi[44].

Akrozom OAM ve IAM ile çevrelenir. Plazma zarı ile OAM arasındaki dar alana periakrozomal katman, IAM ile nükleer zarf arasındaki boşluğa ise perinükleer maddelerin bulunduğu subakrozomal katman (perinükleer teka) adı verilir[10, 45]. Fertilizasyon sırasında İzumo1'in rolünü değerlendirmek için, füzyon sırasında izumo1'in lokalizasyonu mCherry (monomerik kırmızı floresan proteinlerin mFruits ailesinin bir üyesi) etiketli izumo1 kullanılarak araştırılmıştır[3, 10]. İzumo1 akrozomda lokalizedir ve sperm yüzeyinde saptanamaz[46]. İzumo1 başlangıçta AR'den önce plazma membranı altına gizlenir ve daha sonra canlı spermatozoada İzumo1, AR sırasında dış akrozomal zardan plazma membranına taşınır[2, 3, 6]. AR, spermin yumurtalarla kaynaşması için bir ön koşuldur[2]. AR'den sonra sperm plazma zarı

üzerinde izumo1 bulunur[2]. AR sırasında, AC'den başlayarak, WES ve AES'e doğru ilerleyerek sperm başının tamamını kaplar[9]. İzumo1'in yer değiştirmesi, Tssk6'a bağlıdır[8, 9]. Tssk6, AR'den sonra aktin polimerizasyonunun düzenlenmesi yoluyla izumo1'in yeniden dağıtılmasında rol oynar[8, 10]. İlginç bir şekilde, Tssk6 eksik olan farelerden alınan spermatozoanın, yumurta ile kaynaşamadığı görülmüştür ve bu nedenle Tssk6'nın İzumo1 fosforilasyonundan (kısmen) sorumlu olduğunu düşünülmektedir[8]. Bu veriler, izumo1'in sperm-yumurta füzyonunda rol oynadığına dair kesin kanıtlar sağlamıştır[13]. Yetersiz izumo1 erkek fare spermleri oosite bağlanamaz ve infertildir[42, 47].

Üç gamet membran proteininin fertilizasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir: Sperm proteini İzumo1, yumurta reseptörü Juno ve yumurta proteini CD9[48].



Şekil 3.9. Matür insan spermının baş kısmı[10].

İzumo1 ve Juno yapışma bölgesinde CD9 birikimi gerçekleşir ve bu durum İzumo1 zenginleşmesine olanak sağlar[48]. Fare yumurtasındaki CD9 ve spermdeki İzumo1 kritik oyuncular olarak göze çarpmaktadır. CD9 - / - ve İzumo1 - / - fareler sağlıklıdır, ancak kusurlu oldukları için infertildir[49].

### **3.7. ERKEK İNFERTİLİTESİ**

DSÖ, infertiliteyi en az 12 aylık düzenli, korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebe kalamama olarak tanımlamaktadır[1, 50]. İnfertilite dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur ve üreme çağındaki çiftlerin % 8-12'sini etkilediği tahmin edilmektedir[1, 51]. Yapılan araştırmalarda, 1990 ile 2017 arasında, yaşa standardize edilmiş infertilite prevalansının her yıl kadınlarda % 0.370 ve erkeklerde %0.291 arttığını bildirilmiştir[1, 52]. İnfertilite önemli psikolojik ve sosyal problemlere[1, 53, 54] neden olur; hastalar ve sağlık bakım sistemleri üzerinde önemli bir ekonomik yük oluşturur[1, 55].

#### **3.7.1. Erkek İnfertilitesi Nedenleri**

Doğuştan, edinilmiş ve idiyomatik olarak sınıflandırılabilen erkek infertilitesi insidansındaki artışa çok sayıda neden ve risk faktörü katkıda bulunur[1, 56, 57]. Erkek infertilitesinin bilinen birincil genetik nedenleri, kistik fibroz gen mutasyonları ile ilişkili vas deferenslerin konjenital iki taraflı yokluğu, Kallmann sendromu, testis fonksiyonunun bozulmasına yol açan kromozomal anormallikler ve izole spermatogenik kusurlara neden olan Y kromozomu mikrolezyonlarıdır[1, 58]. Edinsel faktörler arasında varikosel, %40 prevalansı ile erkeklerde en yaygın ve düzeltilebilir kısırlık nedenidir[1, 57, 59, 60]. Erkek infertilite vakalarının yaklaşık %30-50'si idiyomatiktir ve fark edilebilir bir nedeni veya buna katkıda bulunan kadın infertilitesi yoktur[1, 61, 62]. Erkek oksidatif stres infertilitesi, değişen semen özelliklerini ve oksidatif stresi içerir ve idiyomatik erkek infertilitesi olan yaklaşık 37 milyon erkeği etkiler[1, 63].

Toksik kimyasallara[1, 64] çevresel veya mesleki maruziyet ve çeşitli yaşam tarzı faktörleri (ör. sigara içmek,[1, 65, 66] ) alkol tüketimi,[1, 67] eğlence amaçlı uyuşturucu kullanımı,[1, 68] obezite,[1, 69, 70] ve psikolojik stres[1, 71] erkek infertilitesi için potansiyel risk faktörleridir[1, 72].

Çizelge 3.1. Erkek infertilitesinin nedenleri ve risk faktörleri[1].

Konjenital Faktörler	Kazanılmış Faktörler	İdiopatik Risk Faktörleri
Anorşi	Varikosel	Sigara içmek
Vas Deferenslerin Yokluğu	Testiküler Travma	Alkol
Kriptoorşidizm	Testiküler Torsiyon	İlaçlar
Y kromozomu mikrolezyonu	Germ Hücre Tümörleri	Obezite
Kromozomal Anomaliler	Hipogonadotropik Hipogonadizm	Psikolojik stres
Klinefelter Sendromu	Tekrarlayan Ürogenital Enfeksiyonlar	İleri baba yaşı
Kallmann Sendromu	Epididimit, Kabakulak, Orşit	Diyet faktörleri
Robersonian Translokasyon	Ürogenital sistem Obstrüksiyonu	Çevresel veya mesleki toksinlere maruz kalma
Androjen duyarsızlık sendromu	Eksojen faktörler ( kemoterapi, ilaçlar, radyasyon, ısı)	
Genetik Endokrinopati	Sistemik hastalıklar (karaciğer sirozu, böbrek yetmezliği)	
Konjenital Obstrüksiyon	Anti-sperm antikorları	
	Cinsel işlev bozukluğu (erektile veya ejakülatuar disfonksiyon)	
	Testis Ameliyatları	

### 3.8. İDİOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ

İdiopatik infertilite, hastada mevcut olan anormal semen analizini açıklayabilecek herhangi bir sebep bulunamaması veya bu parametrelerde ve diğer testlerde herhangi bir kusur görülmemekle hastanın infertilite nedeninin açıklanamaması durumudur. Bu tür herhangi bir kusur taşımayan hastalarda volüm, viskozite, konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi spermogram parametreleri dünya sağlık örgütünün belirlediği kriterlere göre normal olarak değerlendirilmektedir. İnfertil hastaların yaklaşık %25'inde idiyopatik infertilite görülmektedir.[73] İdiopatik erkek infertilitesi genetik, çevresel ve hormonal faktörler gibi birçok faktörden etkilenen bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Günümüzde idiyopatik erkek infertilitesi için klinik olarak kanıtlanmış bir tedavi

bulunmamaktadır[74]. İnsan menopozal gonadotropin (hMG)/insan koryonik gonadotropin (hCG), androjen, antiöstrojenler (klomifen ve tamoksifen), prolaktin inhibitörleri (bromokriptin) ve steroidler gibi ampirik tıbbi tedaviler kullanılmıştır ancak semen parametreleri üzerinde yararlı etkileri kanıtlanmamıştır[61, 75]. Bu nedenle, yardımla üreme tedavilerine başlamadan önce, sigara içme, alkolü bırakma, diyet gibi sağlıklı yaşam tarzı değişiklikleri erkek infertilitesini yönetmenin temel dayanağıdır. Son yıllarda vitamin ve diyet takviyeleri, erkek üreme sağlığını iyileştirmek için popüler olsa da bu yöntemler kanıta dayalı değildir[76].

İdiopatik infertilite genellikle genetik bir temele dayanabilmektedir. Ancak bununla birlikte, erkek infertilitesine neden olan mutasyonlar ve genler hakkında hala çok az şey bilinmektedir[77]. İdiopatik erkek infertilitesinin temellerini bulmaya yönelik halihazırda devam eden birçok çalışma bulunmaktadır. Biz bu çalışmamızda normospermik idiyopatik erkek infertilitesinin, sperm yüzeyinde bulunan bir protein olan sperm İzumo1 proteininin seviyesine bağlı olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

### **3.9. SİGARA KULLANIMININ ERKEK İNFERTİLİTESİNE ETKİSİ**

Sigara kullanımı kardiyovasküler hastalık, solunum yolu hastalığı ve akciğer, mesane, serviks, yemek borusu, böbrek, pankreas ve mide kanseri dahil olmak üzere sayısız sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Ramlau-Hansen ve ark. Sigara kullanımı ile üreme sağlığı arasındaki ilişkiyi araştırmaya başladılar ve bu çalışmaların neticesinde sigara kullanımının semen analizi parametrelerinin üzerine olumsuz etkisi olduğunu açıkça ortaya koydular. Ramlau-Hansen ve ark. tarafından yürütülmüş olan bu çalışmada 1987'den 2004'e kadar 2542 sağlıklı erkeğin semen analizinde, sigara içenlerin sigara içmeyen erkeklere kıyasla daha düşük semen hacmine, sperm sayısına ve hareketli sperm yüzdesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte sigara ve sperm konsantrasyonu arasındaki ilişkinin doza bağımlı olduğu öne sürülmüştür. Bu nedenle günde 20'den fazla sigara içen erkekler, sigara içmeyen erkeklere kıyasla (üreme organlarındaki hastalıkları kontrol ettikten sonra dahi) sperm konsantrasyonunda %19'luk bir azalma yaşamışlardır. Yetişkinlerde sigara içmenin semen kalitesinde orta derecede bozulmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır.[78]

İnfertilite çalışması yapılan 1786 erkekten oluşan 655 sigara içen ve 1131 sigara içmeyen kişinin bulunduğu çalışmada, sigara içenlerin sigara içmeyenlere oranla sperm yoğunluğunda %15.3, toplam sperm sayısında %17.5 ve toplam hareketli spermde %16.6

azalma olduğunu gösterildi[79]. Morfoloji ve ejakülat hacmi gibi parametrelerin sigara kullanımdan önemli olmayacak derecede etkilendiği ortaya konulmuştur. Sigara kullanımının ejakülat hacmi üzerindeki etkileri araştırılan bir çalışmada, sigara içenlerin ejakülat başına semen hacimlerinin sigara içmeyenlere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir[80]. İlginç bir şekilde, bazı çalışmalar sigara içimi ile semen parametreleri üzerindeki olumsuz etkiler arasındaki ilişkiyi ortaya koyamadı. Bu çalışmalardan en büyüğü, infertilite tedavisi gören 2000 İngiliz erkeğinin vaka kontrol çalışmasıdır[81]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, sigara içmenin azalan hareketli sperm konsantrasyonları için bağımsız bir risk faktörü olmadığını göstermiştir. Dikshit ve arkadaşları 16 infertilite kliniklerine başvuran 626 erkek arasında ne sigara içmenin ne de tütün çiğnemenin semen kalitesindeki bozulma için önemli risk faktörleri olmadığını bulmuşlardır[82]. Hassa ve meslektaşları 17223 Türk erkeğinden oluşan bir kohortta benzer sonuçlar elde etmiştir[83].

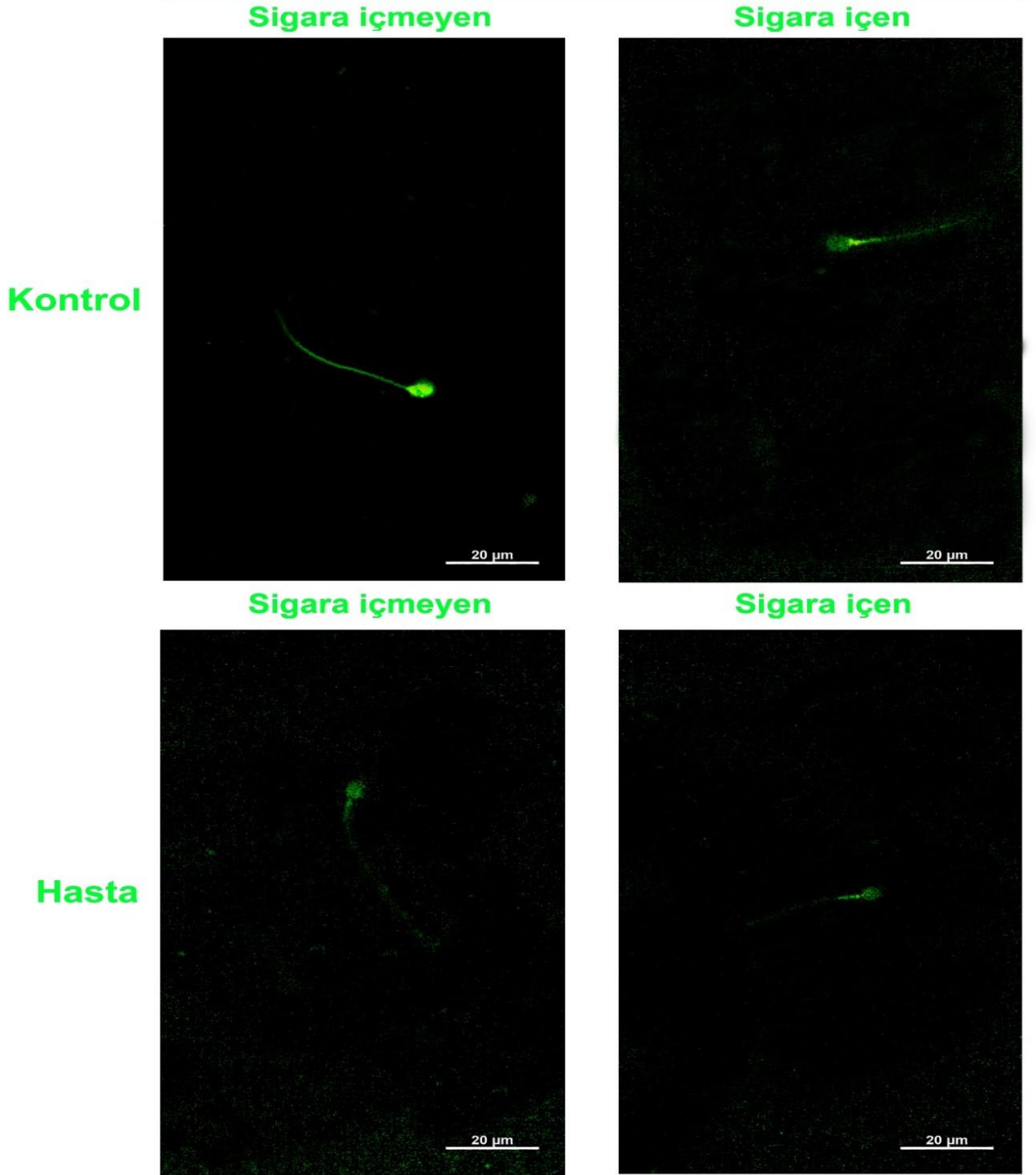
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

İmmünofloresan yöntemle boyanan sperm yaymaları Olympus BX51 marka kameralı mikroskopla fotoğraflandı. Daha sonra bu fotoğraflardaki boyanma yüzdeleri Image J programı kullanılarak hesaplandı. Elde edilen değerlerin istatistiksel analizi IBM SPSS v.22 paket programı ile yapıldı.

### 4.1. İmmünofloresan Boyama Yöntemi ile Sperm İzumo-1 Proteininin Seviyelerinin Gösterilmesi

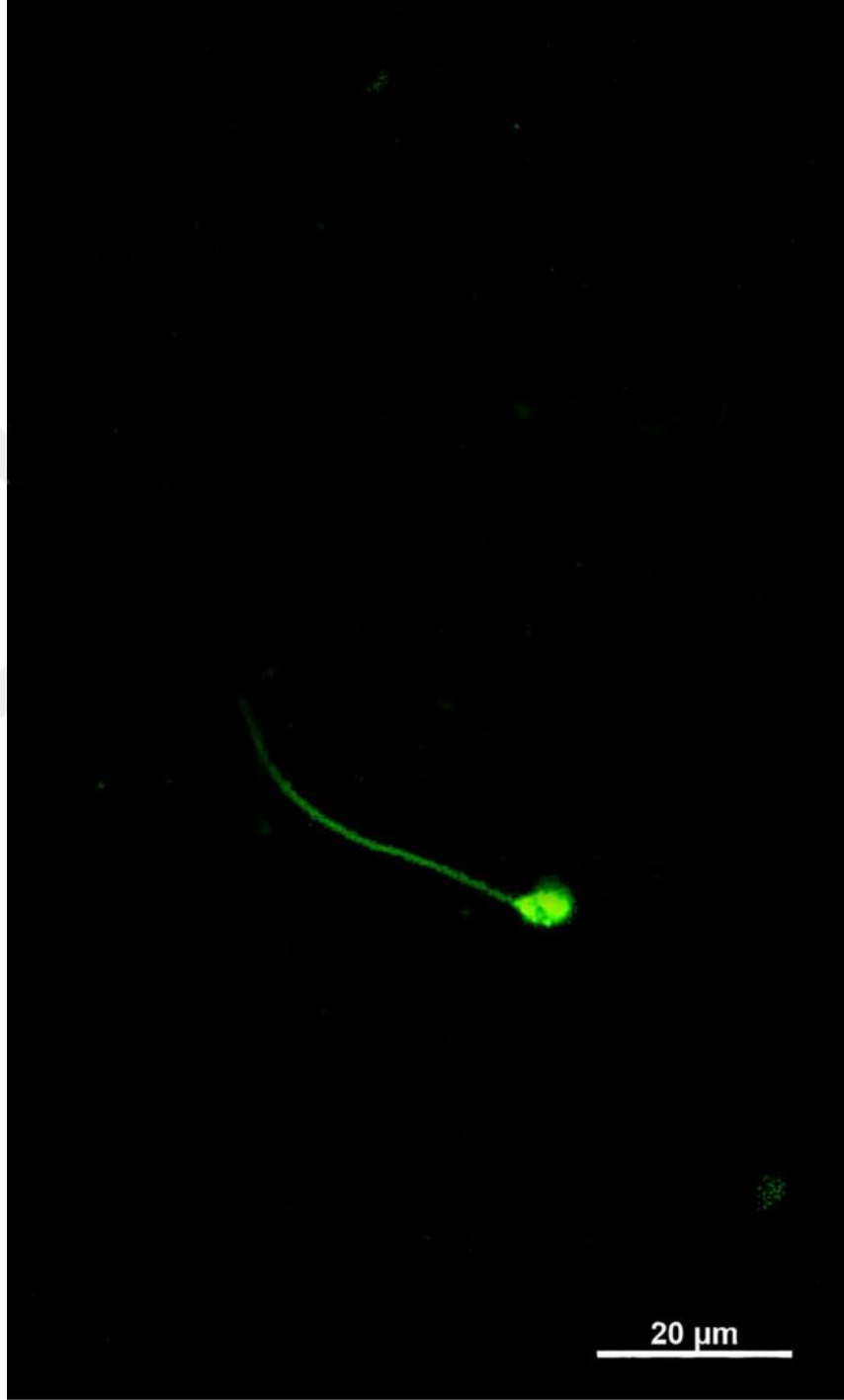
Çalışmamız için toplanan örneklerden oluşturulan 4 ayrı grupta da immünofloresan boyama yapılarak sperm İzumo-1 proteininin seviyelerini belirledik. Elde ettiğimiz verilere göre boyanma seviyeleri farklı olmakla birlikte tüm gruplarda boyanma tespit ettik. Sperm hücrelerinde İzumo-1 ekspresyonu baş bölgesindeki plazma membranı üzerinde gözlemlendi. Gruplar arasında en yüksek İzumo-1 protein ekspresyonu sigara içmeyen kontrol grubunda görülürken, en düşük İzumo-1 protein ekspresyonu ise sigara içen hasta grubunda görüldü. Kontrol gruplarındaki İzumo-1 ekspresyonu, idiopatik infertiliteye sahip hasta gruplarına göre daha fazlaydı. (Şekil 4.1)

## İZUMO 1



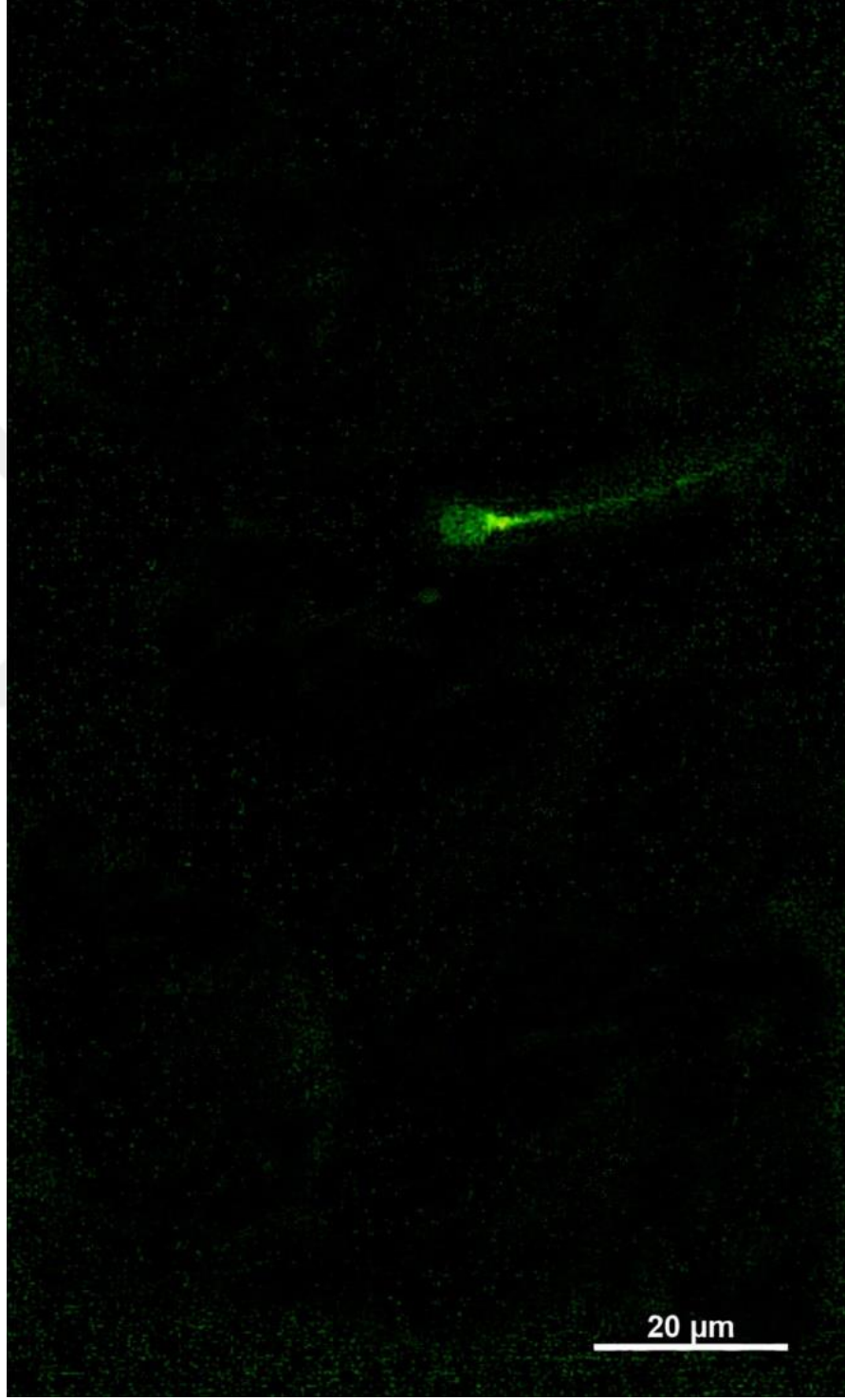
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait İzumo-1 immüno Floresan boyama fotoğrafları. 400x büyütme, Skala Bar 20 mikrometre.

Sigara içmeyen kontrol grubundan alınan sperm yaymaları İzumo-1 protein ekspresyonunun en yoğun görüldüğü yaymalardır. Sperm baş bölgesindeki plazma zarında yoğun boyanma gözlenmektedir. (Şekil 4.2.)



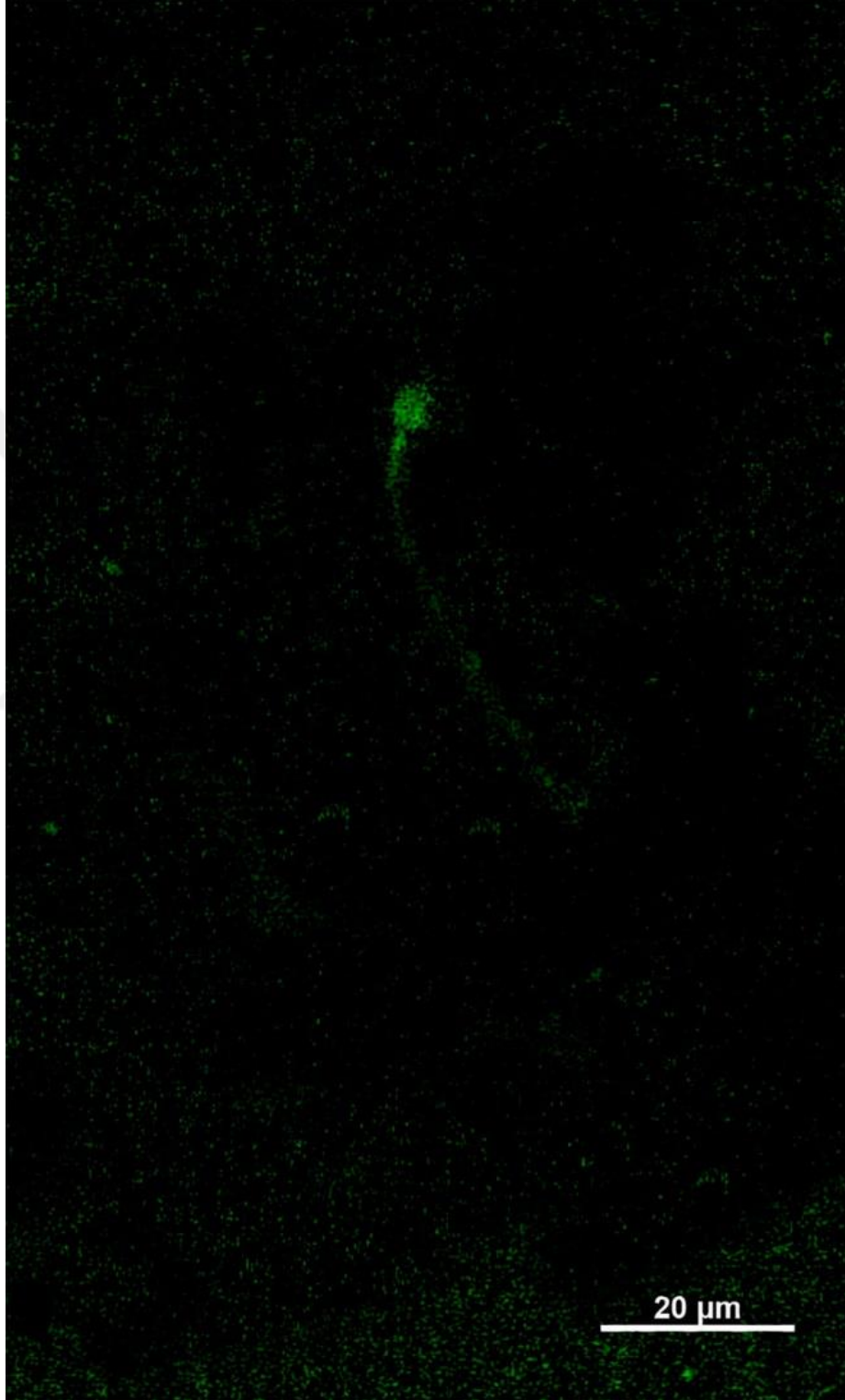
Şekil 4.2. Sigara içmeyen kontrol grubuna ait İzumo-1 ekspresyonunu gösteren fotoğraf.  
Büyütme 400x, Skala Bar 20 mikrometre.

Sigara içen kontrol grubunda sperm başı plazma membranındaki İzumo-1 ekspresyonu hasta gruplara göre daha yoğun olmakla birlikte sigara içmeyen kontrol grubuna göre daha azdı. (Şekil 4.3.)



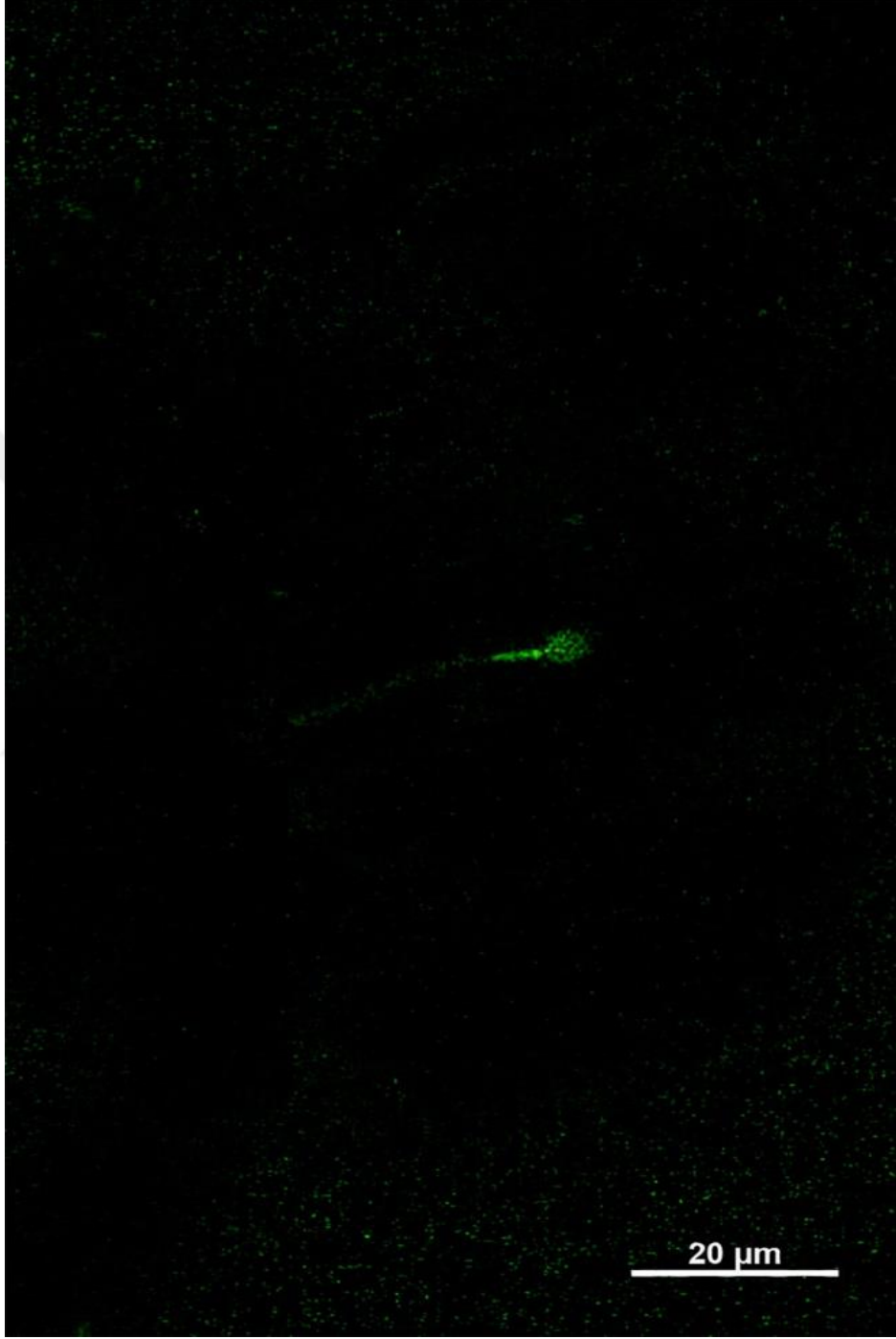
Şekil 4.3. Sigara içen kontrol grubuna ait İzumo-1 ekspresyonunu gösteren fotoğraf.  
Büyütme 400x, Skala Bar 20 mikrometre.

Hasta ve sigara içmeyen gruba ait sperm yaymalarında sperm başı plazma membranındaki İzumo-1 ekspresyonu kontrol gruplarına göre daha az görülürken, hasta sigara içen gruba göre daha yoğun olarak görüldü. ( Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. Hasta ve sigara içmeyen grupta İzumo-1 ekspresyonunu gösteren fotoğraf.  
Büyütme 400x, Skala Bar 20 mikrometre.

Hasta ve sigara içen gruba ait sperm yaymalarında diğer gruplara göre sperm başı plazma membranındaki İzumo-1 ekspresyonu en düşük seviyedeydi. ( Şekil 4.5.)



Şekil 4.5. Hasta ve sigara içen grupta İzumo-1 ekspresyonunu gösteren fotoğraf.  
Büyütme 400x, Skala Bar 20 mikrometre.

## 4.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler IBM SPSS v.22 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin dağılımı Shapiro-Wilk testi ile incelenmiş, protein değerleri üzerine hasta-kontrol grupları ve sigara kullanımının birlikte etkisinin incelenmesi amacıyla iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayısal değişkenler için ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır. (Çizelge 4.1.)

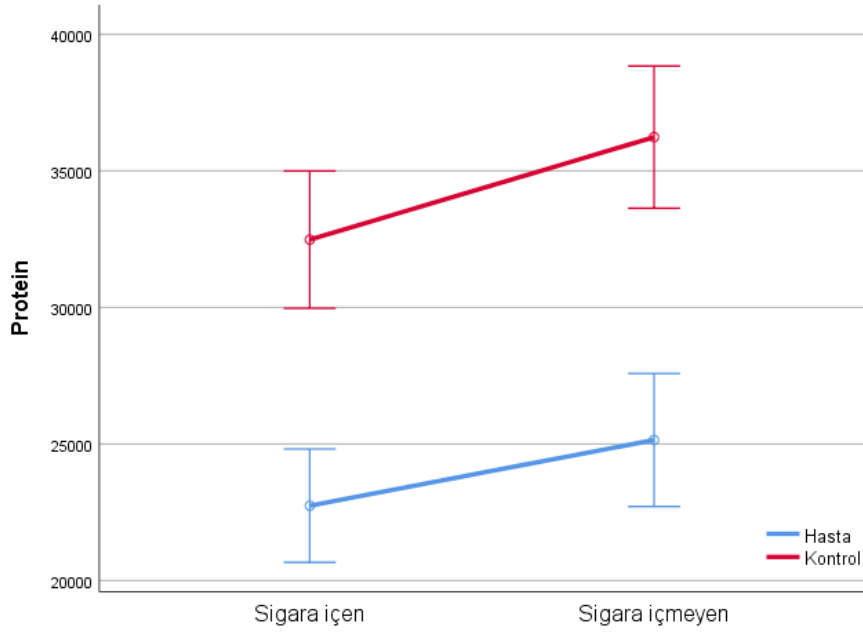
Çizelge 4.1. İzumo-1 protein değerlerinin gruplar üzerindeki dağılım tablosu.

	Hasta	Kontrol	Genel	p
<b>Sigara içen</b>	22737,50±4386,89	32479,20±6109,21	26686,84±7017,97	<b>0,013</b>
<b>Sigara içmeyen</b>	25144,69±2405,70	36232,50±6092,23	30319,00±7161,34	
<b>Genel</b>	23751,05±3836,62	34291,14±6287,81	0,580	
<b>p</b>	<b>&lt;0,001</b>			

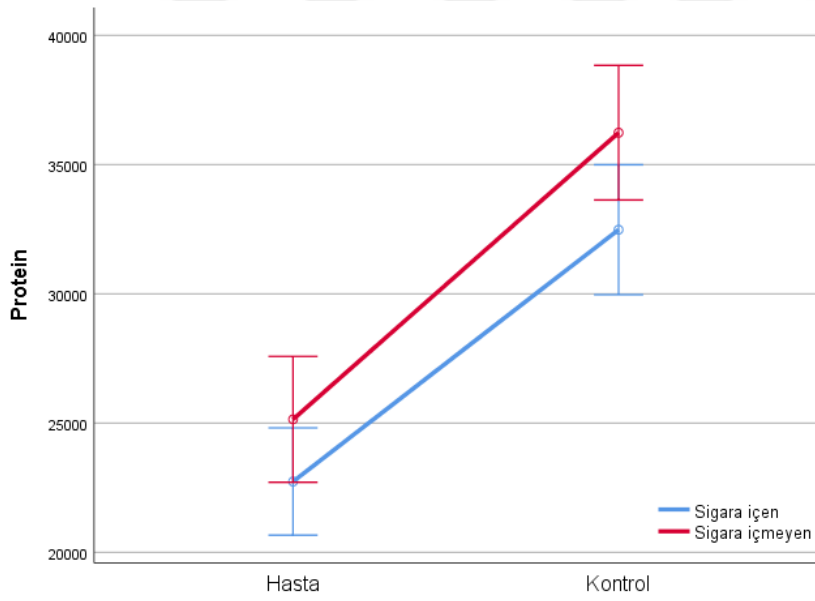
Protein değeri bakımından grup-sigara etkileşimi anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,580$ ). Yani hasta ve kontrol gruplarındaki sigara içme durumuna göre protein değerlerinin değişimi hasta ve kontrol gruplarında benzer şekilde ortaya çıkmakta, her iki grupta da sigara içenlerde protein değerinin daha düşük olduğu görülmektedir.

Grup ana etkisi ( $p<0,001$ ) ve sigara ana etkisi ( $p=0,013$ ) ise anlamlı olup genel olarak hasta grubunda protein değerlerinin daha düşük olduğu ve genel olarak sigara içenlerde protein değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. (Çizelge 4.1.) (Şekil 4.6.) (Şekil 4.7.)

İzumo-1 proteini ekspresyonunun sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu Şekil 4.6'da gösterilmiştir. ( $p=0,013$ ). Şekil 4.6'a göre sigara içmenin idiyopatik infertiliteden bağımsız olarak tek başına İzumo-1 protein ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı da görülmektedir.



Şekil 4.6. Sigara içen ve içmeyenlerde sperm izumo-1 protein seviyelerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.7. İdiopatik infertil hasta ve kontrol gruplarına ait sperm izumo-1 protein seviyelerinin karşılaştırılması.

İzumo-1 proteini ekspresyonunun idiyatik infertiliteye sahip olan hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu Şekil 4.7'de gösterilmiştir. ( $p < 0,001$ ). Şekil 4.7'e göre idiyatik infertiliteye sahip olmanın sigara kullanımından bağımsız olarak tek başına İzumo-1 protein ekspresyonunu anlamlı derecede azalmasıyla ilişkili olduğu da görülmektedir.

DSÖ'ye göre infertilite, çiftlerin 1 yıl korunmasız cinsel ilişki sonucu çocuk sahibi olamaması durumudur. İnfertilite nedenlerinden yaklaşık %50'si erkek faktörüne dayanır. Bu faktörler sigara ve alkol kullanımı, sağlıksız yaşam tarzı, otoimmün hastalıklar, obezite ve genetik nedenler olabilir. Kişiyne infertilite tanısı konulması bir dizin araştırmalar sonucunda karar verilir. Bu araştırmalardan en önemli belirteç semen analizidir. Semen analizi DSÖ'nün belirlediği kriterlere göre yapılmaktadır ve motilite, konsantrasyon, viskozite ve morfoloji gibi kriterlere bakılmaktadır. Bu kriterlerdeki herhangi bir problem kişinin infertil olduğunu göstermektedir fakat bazı hastalarda tüm bu parametreler ve diğer tüm testler normal olmasına rağmen kişi infertil olabilir[84].

İdiyatik infertilite, çiftlerin doğurganlık sorunlarına sahip olduğu ancak nedeninin belirlenemediği bir durumdur. İdiyatik terimi, "nedeni bilinmeyen" anlamına gelir. Sperm parametrelerinde veya diğer faktörlerde nedeni net bir şekilde belirlenmeyen ve saptanamayan bir kusur idiyatik infertiliteye neden olur[84].

Sperm İzumo1 proteini memelilerde sperm-oosit etkileşimini sağlayan bir immünoglobulin benzeri alana ve varsayılan bir N-glikozit bağlantı motifine sahip bir tip I membran glikoproteindir[10]. Adını Japon mitolojisinden alan İzumo1, spermin yumurta hücreğine bağlanır ve fertilizasyon sürecinde kritik bir rol oynar[85]. İzumo1 spermin akrozom bölümüne gizlenmiştir ve olgun spermin yüzeyinde tespit edilemez. AR'nin çok erken bir aşamasında İzumo1, akrozom başlığında ve ardından AA, PA ve PAR dahil olmak üzere başın tüm yüzeyinde saptanabilir hale gelir[86, 87]. Fertilizasyon sürecinde, sperm yumurta hücreğine temas ettiğinde İzumo1 proteini aktif hale gelir. İzumo1, oosit yüzeyindeki Juno reseptörü ile etkileşime girer ve sperm-oosit birleşmesi sağlanır. Bu etkileşim, İzumo1-Juno etkileşimi olarak adlandırılır. İzumo1 proteini, bu etkileşim sayesinde spermi yumurta hücreğine bağlar ve fertilizasyonun gerçekleşmesini sağlar[87]. İzumo1 proteini, fertilizasyon sürecindeki kritik rolü nedeniyle infertilite ile ilişkilendirilmiştir. İzumo1 genindeki mutasyonlar veya genetik değişiklikler, İzumo1 proteini sentezinde sorunlara yol açabilir ve sperm-oosit etkileşimini olumsuz etkileyebilir. Bu durum, fertilizasyonun gerçekleşmesini

engelleyebilir. İzumo1 proteininden yoksun fareler sağlıklı olmalarına ve ejakülasyona sahip olmalarına rağmen bu fareler kısırdir[2, 40]. In vitro fertilizasyon (IVF) sonuçları ile, spermın ZP penetrasyonundan sonra İzumo1'in ortaya çıktığı gösterildi. İzumo1'den eksik spermın, oosit zarı ile füzyon olmaksızın oositin perivitellin boşluğunda biriktiği gözlenmiştir.[2, 40] Erkek İzumo1 - / - gametleri normal sperm hücre sayıları üretse de , normal motilite ve morfoloji ile bu hayvanlar tamamen infertildir[42].

Sigara kullanımının erkek üreme sağlığı üzerindeki etkileri çoğu kez araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda sigara kullanımının sperm yoğunluğu, hareketliliği ve morfolojisi üzerinde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir[88]. Sigaranın zararlı etkilerini ortaya çıkartan kanıtlara rağmen, DSÖ'nün son raporlarının da kanıtladığı gibi, sigara içmek hala yaygın bir durumdur[89]. Arsenik, kadmiyum ve kurşun gibi bazı kimyasallar sigara yanması sırasında rutin olarak solunur[89, 90]. Bu metallerin tümü mutajenik özelliklere sahiptir ve semen hacmi, konsantrasyonu ve motilitesinde anlamlı bir fark olmamasına rağmen benzer şekilde artan erkek kısırlığı riski ile ilişkilidir[89, 91, 92]. 2500'den fazla erkek üzerinde yapılan bir meta-analizde, hiç sigara içmemiş olanlar ile halen sigara içenlerin sperm konsantrasyonları karşılaştırıldığında, sigara içenlerde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Kunzle ve arkadaşları doğurganlık değerlendirmesi için yaptıkları bir çalışmada çalışmaya başvuran 2100 erkekte sigara içme ve düşük sperm konsantrasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır[79, 89]. Düşük sperm parametrelerine neden olan mekanizmalar halihazırda araştırılmaya devam ediliyor ve kesin kanıtlar hala eksiktir. Çok sigara içenlerde çoğunlukla, aksonemal mikrotübülleri ve kuyruk değişikliklerini etkileyen ultra-yapısal anormallikler gözlenmiştir[89, 93, 94]. Aynı zamanda sigara kullanımının fertilizasyon için gerekli olan akrozom reaksiyonunu ve kapasitasyonu bozduğu bildirilmiştir[89, 95, 96]. Bununla birlikte, sigara içmenin FSH ve LH üretimi üzerindeki etkileri konusunda genel bir fikir birliği olmadığı görülmektedir[89]. Bazı çalışmalar, sigara içenler arasında her iki hormonunda daha düşük seviyelerini gösterirken, farklı araştırmacılar ise tütün tüketimini takiben LH ve FSH konsantrasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir[89, 97, 98]. Tüm olası faktörler göz önüne alındığında, sigara içenler arasında testosteron konsantrasyonunun tespit edilmesi oldukça zordur: bazı çalışmalar sigara içenlerde serum testosteron ve dehidroepiandrosteron düzeylerinin arttığını bildirmiştir[89, 97, 99]. Öte yandan diğer çalışmalar ise ortalama testosteron düzeylerinin sigara içenler ve içmeyenler arasında önemli ölçüde farklı olmadığını öne sürmüşlerdir[89, 100]. 2012'de Amerikan

Üreme Tıbbı Derneği, sigara içenlerde içmeyenlere göre semen parametreleri ve sperm fonksiyon testlerinin sonuçlarının %22 daha zayıf olduğunu ve etkilerinin doza bağımlı olduğunu belirtti[88]. Sigaranın infertilite üzerindeki etkilerinin araştırılan bir diğer çalışmada toplam 5865 kişi üzerinde yapılan bir meta-analiz çalışması, orta ve ağır sigara içenlerin sperm sayısında ve hareketliliğinde azalma olasılığının daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur[66]. Araştırmalarda ortaya konulan veriler, sigara içmenin spermatogenez üzerinde önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir[89]. Fakat öte yandan, sigaranın erkek infertilitesi üzerindeki etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır ve bu konuyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu nedenle hem kadınlarda hem de erkeklerde sigaranın bırakılmasını ve pasif içiciliğin azaltılması infertilitenin önüne geçebilmek için önerilmektedir[89].

Yukarıda anlatılan çalışmalarda sigara kullanımının sperm parametreleri üzerine etkileri araştırılmasına rağmen, şu ana kadar yapılan çalışmalarda sigara kullanımının sperm İzumo-1 ekspresyonunu nasıl etkilediğine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Biz de bu nedenle bu çalışmamızda idiopatik infertilite tanısı almış normospermik olan hastaların spermlerinde sigara kullanımına bağlı olarak İzumo1 proteininin ekspresyonundaki değişikliği göstermeyi amaçladık.

Çalışmamızın sonucunda sigara kullanımı olan idiopatik infertilite tanısı almış hastalarda sperm izumo-1 ekspresyonu diğer gruplara göre anlamlı derecede daha düşük bulundu. Sigara kullanmayan kontrol grubunda ise sperm izumo-1 protein ekspresyonu en yüksek seviyedeydi. Bu çalışmada ayrıca idiopatik infertilitenin ve sigara kullanımının birbirinden bağımsız olarak da sperm İzumo-1 ekspresyonunu anlamlı derecede düşürdüğünü gösterdik. Bu sonuç bize sigaranın sperm parametrelerini düşürmesinin yanı sıra sperm-oosit füzyonu için gerekli olan İzumo-1 seviyesini de anlamlı derecede düşürerek infertiliteye neden olabileceğini göstermiştir.

Sigaranın sperm izumo-1 ekspresyonunu düşürmesinin sebebi sigara içindeki kimyasal maddelerin ve ağır metallerin oksidatif stresi artırması ve spermde DNA hasarına yol açması nedeniyle olabilir. Normospermik idiopatik erkeklerde İzumo1 proteinindeki anormal azalma (genetik veya translasyon sonrası denatürasyon) nedeni bilinmeyen infertilite için bir bulgudur.

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak sigara kullanımının sperm parametreleri üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Biz de bu çalışmayla sigaranın sperm-oosit birleşmesinde anahtar rol oynayan sperm İzumo-1 seviyelerini azaltarak da infertilite oluşumuna neden olabileceğini göstermiş olduk. Sigaranın sperm İzumo-1 ekspresyonunu düşürmesinin sebebi sigara içindeki kimyasal maddelerin ve ağır metallerin oksidatif stresi artırması ve spermde DNA hasarına yol açması nedeniyle olabilir. Bunun mekanizmasının anlaşılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca İzumo1 protein ekspresyonunun hastalarda azalması idiopatik infertilitenin açıklanamayan bir sebebi olabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] Agarwal, A., S. Baskaran, N. Parekh, C.L. Cho, R. Henkel, S. Vij, M. Arafa, M.K. Panner Selvam&R. Shah, "Male infertility." *Lancet*, c. 397, sayı(10271), ss. 319-333, 2021.
- [2] Inoue, N., M. Ikawa, A. Isotani&M. Okabe, "The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs." *Nature*, c. 434, sayı(7030), ss. 234-8, 2005.
- [3] Satouh, Y., N. Inoue, M. Ikawa&M. Okabe, "Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1." *J Cell Sci*, c. 125, sayı(Pt 21), ss. 4985-90, 2012.
- [4] Hernandez-Falco, M., P. Saez-Espinosa, A. Lopez-Botella, J. Aizpurua&M.J. Gomez-Torres, "The Role of Sperm Proteins IZUMO1 and TMEM95 in Mammalian Fertilization: A Systematic Review." *Int J Mol Sci*, c. 23, sayı(7), 2022.
- [5] Inoue, N., "Novel insights into the molecular mechanism of sperm-egg fusion via IZUMO1." *J Plant Res*, c. 130, sayı(3), ss. 475-478, 2017.
- [6] Okabe, M., T. Adachi, K. Takada, H. Oda, M. Yagasaki, Y. Kohama&T. Mimura, "Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro." *J Reprod Immunol*, c. 11, sayı(2), ss. 91-100, 1987.
- [7] Yanagimachi, R., " Mammalian fertilization." *In The Physiology of Reproduction*, c. 2, 1994.
- [8] Julian Sosnik 1, P.V.M., Nikolay A Spiridonov, Sook-Young Yoon, Rafael A Fissore, Gibbes R Johnson, Pablo E Visconti, "Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse." *J Cell Sci*. 2009 Aug 1; 122(15): 2741–2749., c., 2009.
- [9] Sebkova, N., L. Ded, K. Vesela&K. Dvorakova-Hortova, "Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction." *Reproduction*, c. 147, sayı(2), ss. 231-40, 2014.
- [10] Ito, C.&K. Toshimori, "Acrosome markers of human sperm." *Anat Sci Int*, c. 91, sayı(2), ss. 128-42, 2016.
- [11] *WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi*, G. KAZANCI. c. (5), İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2010, 224.
- [12] Jangueria, L.C.&J. Carneiro, *Temel histoloji*. (Çev. Y. AYTEKİN ve S. SOLAKOĞLU) c. (11), Nobel Tıp Kitabevleri, 2006, 431-443.
- [13] Ross, M.H.&W. Pawlina, *Erkek üreme sistemi, in Histoloji konu anlatımı ve atlas, ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji*. (Çev. B. Baykal) . c. (6), Ankara: Palme Yayıncılık, 2014, 787,788.
- [14] Scanlon, V.C.&T. Sanders, *Essentials of Anatomy and Physiology*, c. (5), Philadelphia: F. A. Davis Company, 2007, 457.
- [15] Standring, S., *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, c. (40), Elseiver, 2016, 417.
- [16] Moore, K.L., A.F. Dalley&A.M.R. Agur, *Clinically Oriented Anatomy*, c. (8), Philadelphia: Wolters Kluwer, 2018, 1026-1030.

- [17] Sancak, B.&M. Cumhuri, *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar*, c. (5), Ankara: ODTÜ Yayıncılık, 1999, 118-220.
- [18] Arıncı, K.&A. Elhan, *Anatomi*, c. (1), Ankara: Güneş Kitabevi, 2006,
- [19] Young, B., G. O'Dowd&P. Woodford, *Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas*, c. (6), ABD: ELSEVIER, 2013, 337-344.
- [20] Gartner, L.P.&L.J. Hiatt, *Color textbook of histology* c. (2), Philadelphia: Saunders Company, 2001, 494- 495.
- [21] Gökmen, F.G., *Sistemik Anatomi*, c. (1), İzmir: Güven Kitabevi, 2003,
- [22] Eşrefoğlu, M., *Histoloji Atlası*, c. (1), İstanbul Tıp Kitabevleri, 2018, 303-304.
- [23] Şeftalioğlu, A., *Genel ve özel insan embriyolojisi*, c. (3), Ankara: Feryal Matbaası, 1998, 346-50.
- [24] Jost, A., S. Magre&R. Agelopoulou, "Early stages of testicular differentiation in the rat." *Hum Genet*, c. 58, sayı(1), ss. 59-63, 1981.
- [25] Trainer, T.D., "Histology of the normal testis." *Am J Surg Pathol*, c. 11, sayı(10), ss. 797-809, 1987.
- [26] Chen, H., M.P. Hardy, I. Huhtaniemi&B.R. Zirkin, "Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown Norway rat." *J Androl*, c. 15, sayı(6), ss. 551-7, 1994.
- [27] Mruk, D.D.&C.Y. Cheng, "The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation." *Endocr Rev*, c. 36, sayı(5), ss. 564-91, 2015.
- [28] Meng, Z., Y. Liu, J. Zhou, B. Zheng&J. Lv, "Drug transport across the blood-testis barrier." *Am J Transl Res*, c. 14, sayı(9), ss. 6412-6423, 2022.
- [29] Mao, B., T. Bu, D. Mruk, C. Li, F. Sun&C.Y. Cheng, "Modulating the Blood-Testis Barrier Towards Increasing Drug Delivery." *Trends Pharmacol Sci*, c. 41, sayı(10), ss. 690-700, 2020.
- [30] Cheng, C.Y.&D.D. Mruk, "Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development." *Physiol Rev*, c. 82, sayı(4), ss. 825-74, 2002.
- [31] Krause, W.J., *KRAUSE'S ESSENTIAL HUMAN HISTOLOGY FOR MEDICAL STUDENTS* c. (3), Columbia: 2005, 226-229.
- [32] Hassa, H., *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve İvivo Laboratuar Uygulamaları*, c. Eskişehir Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2003,
- [33] Hoogendijk, C.F., T.F. Kruger&R. Menkveld, *Spermatozonun Anatomisi ve Moleküler Morfolojisi. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi Kitabı*, M. Kilciler. c. İstanbul: Habitat Yayıncılık, 2010,
- [34] Guyton, A.C.&J.E. Hall, *Textbook Of Medical Phsyiology*, H. Cavusoglu and Y. Caglayan. c. (11), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007,
- [35] Kierszenbaum, A.L., *Histology and Cell Biology*, R. Demir. c. (1), Ankara: Palme Yayıncılık, 2006,
- [36] Noyan, A., *Yaşamda Ve Hekimlikte Fizyoloji*, c. (8), Ankara: Meteksan Anonim Şirketi, 1993,

- [37] Flint, M., F. Lampiao, A. Agarwal&S.S. du Plessis, *Sperm Assessment: Traditional Approaches and Their Indicative Value*, c. New York: In Practical Manual of In Vitro Fertilization, Springer, 2012,
- [38] Schoenwolf, G.C., S.B. Bleyl, P.R. Brauer&P.H. Francis-West, *Larsen's Human Embryology*, c. (5), Philadelphia: ELSEVIER, 2014,
- [39] Moore, K.L., T.V.N. Persaud&M.G. Torchia, *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi* H. Dalçık. c. (10), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2016, 260- 262.
- [40] Mou, L.&N. Xie, "Male infertility-related molecules involved in sperm-oocyte fusion." *J Reprod Dev*, c. 63, sayı(1), ss. 1-7, 2017.
- [41] Inoue, N., M. Ikawa&M. Okabe, "The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion." *Asian J Androl*, c. 13, sayı(1), ss. 81-7, 2011.
- [42] Young, S.A., J. Aitken&M.A. Baker, "Phosphorylation of Izumo1 and Its Role in Male Infertility." *Asian J Androl*, c. 17, sayı(5), ss. 708-10, 2015.
- [43] Allingham, J.&W.B. Floriano, "Genetic diversity in the IZUMO1-JUNO protein-receptor pair involved in human reproduction." *PLoS One*, c. 16, sayı(12), ss. e0260692, 2021.
- [44] Okabe, M., "Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals." *Asian J Androl*, c. 17, sayı(4), ss. 646-52, 2015.
- [45] Toshimori, K.&E.M. Eddy, *The Spermatozoon*, in *In The Physiology of Reproduction*, A. Zeleznik and T.M. Plant, Editors. 2014.
- [46] Sun, T.C., J.H. Wang, X.X. Wang, X.M. Liu, C.L. Zhang, C.F. Hao, W.Z. Ma, S.L. Deng&Y.X. Liu, "Effects of sperm proteins on fertilization in the female reproductive tract." *Front Biosci (Landmark Ed)*, c. 24, sayı(4), ss. 735-749, 2019.
- [47] Inoue, N., D. Hamada, H. Kamikubo, K. Hirata, M. Kataoka, M. Yamamoto, M. Ikawa, M. Okabe&Y. Hagihara, "Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion." *Development*, c. 140, sayı(15), ss. 3221-9, 2013.
- [48] Chalbi, M., V. Barraud-Lange, B. Ravaux, K. Howan, N. Rodriguez, P. Soule, A. Ndzoudi, C. Boucheix, E. Rubinstein, J.P. Wolf, A. Ziyyat, E. Perez, F. Pincet&C. Gourier, "Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization." *Development*, c. 141, sayı(19), ss. 3732-9, 2014.
- [49] Evans, J.P., "Sperm-egg interaction." *Annu Rev Physiol*, c. 74, ss. 477-502, 2012.
- [50] Zegers-Hochschild, F., G.D. Adamson, S. Dyer, C. Racowsky, J. de Mouzon, R. Sokol, L. Rienzi, A. Sunde, L. Schmidt, I.D. Cooke, J.L. Simpson&S. van der Poel, "The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017." *Fertil Steril*, c. 108, sayı(3), ss. 393-406, 2017.
- [51] Vander Borcht, M.&C. Wyns, "Fertility and infertility: Definition and epidemiology." *Clin Biochem*, c. 62, ss. 2-10, 2018.
- [52] Sun, H., T.T. Gong, Y.T. Jiang, S. Zhang, Y.H. Zhao&Q.J. Wu, "Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017." *Aging (Albany NY)*, c. 11, sayı(23), ss. 10952-10991, 2019.
- [53] Bak, C.W., H.H. Seok, S.H. Song, E.S. Kim, Y.S. Her&T.K. Yoon, "Hormonal imbalances and psychological scars left behind in infertile men." *J Androl*, c. 33, sayı(2), ss. 181-9, 2012.

- [54] Slade, P., C. O'Neill, A.J. Simpson&H. Lashen, "The relationship between perceived stigma, disclosure patterns, support and distress in new attendees at an infertility clinic." *Hum Reprod*, c. 22, sayı(8), ss. 2309-17, 2007.
- [55] Wu, A.K., P. Elliott, P.P. Katz&J.F. Smith, "Time costs of fertility care: the hidden hardship of building a family." *Fertil Steril*, c. 99, sayı(7), ss. 2025-30, 2013.
- [56] Krausz, C., "Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, c. 25, sayı(2), ss. 271-85, 2011.
- [57] Salonia, A., C. Bettocchi, L. Boeri, P. Capogrosso, J. Carvalho, N.C. Cilesiz, A. Cocci, G. Corona, K. Dimitropoulos, M. Gul, G. Hatzichristodoulou, T.H. Jones, A. Kadioglu, J.I. Martinez Salamanca, U. Milenkovic, V. Modgil, G.I. Russo, E.C. Serefoglu, T. Tharakan, P. Verze, S. Minhas, E.A.U.W.G.o.M. Sexual&H. Reproductive, "European Association of Urology Guidelines on Sexual and Reproductive Health-2021 Update: Male Sexual Dysfunction." *Eur Urol*, c. 80, sayı(3), ss. 333-357, 2021.
- [58] Salonia, A., G. Rastrelli, G. Hackett, S.B. Seminara, I.T. Huhtaniemi, R.A. Rey, W.J.G. Hellstrom, M.R. Palmert, G. Corona, G.R. Dohle, M. Khera, Y.M. Chan&M. Maggi, "Paediatric and adult-onset male hypogonadism." *Nat Rev Dis Primers*, c. 5, sayı(1), ss. 38, 2019.
- [59] Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., R. Society for Male&Urology, "Report on varicocele and infertility: a committee opinion." *Fertil Steril*, c. 102, sayı(6), ss. 1556-60, 2014.
- [60] Damsgaard, J., U.N. Joensen, E. Carlsen, J. Erenpreiss, M. Blomberg Jensen, V. Matulevicius, B. Zilaitiene, I.A. Olesen, A. Perheentupa, M. Punab, A. Salzbrunn, J. Toppari, H.E. Virtanen, A. Juul, N.E. Skakkebaek&N. Jorgensen, "Varicocele Is Associated with Impaired Semen Quality and Reproductive Hormone Levels: A Study of 7035 Healthy Young Men from Six European Countries." *Eur Urol*, c. 70, sayı(6), ss. 1019-1029, 2016.
- [61] Jungwirth, A., A. Giwercman, H. Tournaye, T. Diemer, Z. Kopa, G. Dohle, C. Krausz&I. European Association of Urology Working Group on Male, "European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update." *Eur Urol*, c. 62, sayı(2), ss. 324-32, 2012.
- [62] Chehab, M., A. Madala&J.C. Trussell, "On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility." *Fertil Steril*, c. 103, sayı(3), ss. 595-604, 2015.
- [63] Agarwal, A., N. Parekh, M.K. Panner Selvam, R. Henkel, R. Shah, S.T. Homa, R. Ramasamy, E. Ko, K. Tremellen, S. Esteves, A. Majzoub, J.G. Alvarez, D.K. Gardner, C.N. Jayasena, J.W. Ramsay, C.L. Cho, R. Saleh, D. Sakkas, J.M. Hotaling, S.D. Lundy, S. Vij, J. Marmar, J. Gosalvez, E. Sabanegh, H.J. Park, A. Zini, P. Kavoussi, S. Micic, R. Smith, G.M. Busetto, M.E. Bakircioglu, G. Haidl, G. Balercia, N.G. Puchalt, M. Ben-Khalifa, N. Tadros, J. Kirkman-Browne, S. Moskovtsev, X. Huang, E. Borges, D. Franken, N. Bar-Chama, Y. Morimoto, K. Tomita, V.S. Srin, W. Ombelet, E. Baldi, M. Murtatori, Y. Yumura, S. La Vignera, R. Kosgi, M.P. Martinez, D.P. Evenson, D.S. Zylbersztejn, M. Roque, M. Cocuzza, M. Vieira, A. Ben-Meir, R. Orvieto, E. Levitas, A. Wisner, M. Arafa, V. Malhotra, S.J. Parekattil, H. Elbardisi, L. Carvalho, R. Dada, C. Sifer, P. Talwar, A. Gudeloglu, A.M.A. Mahmoud, K. Terras, C. Yazbeck, B. Nebojsa, D. Durairajanayagam, A. Mounir, L.G. Kahn, S. Baskaran, R.D. Pai, D. Paoli, K. Leisegang, M.R. Moein, S. Malik, O. Yaman, L. Samanta, F. Bayane, S.K. Jindal, M. Kendirci, B. Altay, D. Perovic&A. Harlev, "Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for

- Management of Idiopathic Male Infertility." *World J Mens Health*, c. 37, sayı(3), ss. 296-312, 2019.
- [64] Ma, Y., X. He, K. Qi, T. Wang, Y. Qi, L. Cui, F. Wang&M. Song, "Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health." *J Environ Sci (China)*, c. 77, ss. 210-217, 2019.
- [65] Taha, E.A., A.M. Ez-Aldin, S.K. Sayed, N.M. Ghandour&T. Mostafa, "Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men." *Urology*, c. 80, sayı(4), ss. 822-5, 2012.
- [66] Sharma, R., A. Harlev, A. Agarwal&S.C. Esteves, "Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen." *Eur Urol*, c. 70, sayı(4), ss. 635-645, 2016.
- [67] Ricci, E., S. Al Beitawi, S. Cipriani, M. Candiani, F. Chiaffarino, P. Vigano, S. Noli&F. Parazzini, "Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis." *Reprod Biomed Online*, c. 34, sayı(1), ss. 38-47, 2017.
- [68] Gundersen, T.D., N. Jorgensen, A.M. Andersson, A.K. Bang, L. Nordkap, N.E. Skakkebaek, L. Priskorn, A. Juul&T.K. Jensen, "Association Between Use of Marijuana and Male Reproductive Hormones and Semen Quality: A Study Among 1,215 Healthy Young Men." *Am J Epidemiol*, c. 182, sayı(6), ss. 473-81, 2015.
- [69] Eisenberg, M.L., S. Kim, Z. Chen, R. Sundaram, E.F. Schisterman&G.M. Buck Louis, "The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study." *Hum Reprod*, c. 29, sayı(2), ss. 193-200, 2014.
- [70] Gaskins, A.J., M.C. Afeiche, R. Hauser, P.L. Williams, M.W. Gillman, C. Tanrikut, J.C. Petrozza&J.E. Chavarro, "Paternal physical and sedentary activities in relation to semen quality and reproductive outcomes among couples from a fertility center." *Hum Reprod*, c. 29, sayı(11), ss. 2575-82, 2014.
- [71] Nargund, V.H., "Effects of psychological stress on male fertility." *Nat Rev Urol*, c. 12, sayı(7), ss. 373-82, 2015.
- [72] Durairajanayagam, D., "Lifestyle causes of male infertility." *Arab J Urol*, c. 16, sayı(1), ss. 10-20, 2018.
- [73] Keskin, M.Z., S. Budak&Y.Ö. İlbey, "İdiopatik erkek infertilitesi güncel medikal tedavi yaklaşımı." *Erkek Üreme Sağlığı*, c. 18(64), ss. 40-43, 2016.
- [74] Martins da Silva, S.J., S.G. Brown, K. Sutton, L.V. King, H. Ruso, D.W. Gray, P.G. Wyatt, M.C. Kelly, C.L.R. Barratt&A.G. Hope, "Drug discovery for male subfertility using high-throughput screening: a new approach to an unsolved problem." *Hum Reprod*, c. 32, sayı(5), ss. 974-984, 2017.
- [75] Isidori, A.M., C. Pozza, D. Gianfrilli&A. Isidori, "Medical treatment to improve sperm quality." *Reprod Biomed Online*, c. 12, sayı(6), ss. 704-14, 2006.
- [76] Martins da Silva, S.J., "Male infertility and antioxidants: one small step for man, no giant leap for andrology?." *Reprod Biomed Online*, c. 39, sayı(6), ss. 879-883, 2019.
- [77] Bracke, A., K. Peeters, U. Punjabi, D. Hoogewijs&S. Dewilde, "A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility." *Reprod Biomed Online*, c. 36, sayı(3), ss. 327-339, 2018.

- [78] Ramlau-Hansen, C.H., A.M. Thulstrup, A.S. Aggerholm, M.S. Jensen, G. Toft&J.P. Bonde, "Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis." *Hum Reprod*, c. 22, sayı(1), ss. 188-96, 2007.
- [79] Kunzle, R., M.D. Mueller, W. Hanggi, M.H. Birkhauser, H. Drescher&N.A. Bersinger, "Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples." *Fertil Steril*, c. 79, sayı(2), ss. 287-91, 2003.
- [80] Saaranen, M., S. Suonio, O. Kauhanen&S. Saarikoski, "Cigarette smoking and semen quality in men of reproductive age." *Andrologia*, c. 19, sayı(6), ss. 670-6, 1987.
- [81] Povey, A.C., J.A. Clyma, R. McNamee, H.D. Moore, H. Baillie, A.A. Pacey, N.M. Cherry&C. - u. Participating Centres of, "Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study." *Hum Reprod*, c. 27, sayı(9), ss. 2799-806, 2012.
- [82] Dikshit, R.K., J.G. Buch&S.M. Mansuri, "Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males." *Fertil Steril*, c. 48, sayı(2), ss. 334-6, 1987.
- [83] Hassa, H., A. Yildirim, C. Can, M. Turgut, H.M. Tanir, T. Senses&F. Sahin-Mutlu, "Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic." *Clin Exp Obstet Gynecol*, c. 33, sayı(1), ss. 19-22, 2006.
- [84] Pandruvada, S., R. Royfman, T.A. Shah, P. Sindhvani, J.M. Dupree, S. Schon&T. Avidor-Reiss, "Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility." *J Assist Reprod Genet*, c. 38, sayı(2), ss. 265-276, 2021.
- [85] Ohto, U., H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, N. Inoue&T. Shimizu, "Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization." *Nature*, c. 534, sayı(7608), ss. 566-9, 2016.
- [86] Okabe, M., "The cell biology of mammalian fertilization." *Development*, c. 140, sayı(22), ss. 4471-9, 2013.
- [87] Bianchi, E., B. Doe, D. Goulding&G.J. Wright, "Jun0 is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization." *Nature*, c. 508, sayı(7497), ss. 483-7, 2014.
- [88] Practice Committee of American Society for Reproductive, M., "Smoking and infertility." *Fertil Steril*, c. 90, sayı(5 Suppl), ss. S254-9, 2008.
- [89] Sansone, A., C. Di Dato, C. de Angelis, D. Menafra, C. Pozza, R. Pivonello, A. Isidori&D. Gianfrilli, "Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility." *Reprod Biol Endocrinol*, c. 16, sayı(1), ss. 3, 2018.
- [90] Jurasovic, J., P. Cvitkovic, A. Pizent, B. Colak&S. Telisman, "Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects." *Biometals*, c. 17, sayı(6), ss. 735-43, 2004.
- [91] Wang, X., J. Zhang, W. Xu, Q. Huang, L. Liu, M. Tian, Y. Xia, W. Zhang&H. Shen, "Low-level environmental arsenic exposure correlates with unexplained male infertility risk." *Sci Total Environ*, c. 571, ss. 307-13, 2016.
- [92] de Angelis, C., M. Galdiero, C. Pivonello, C. Salzano, D. Gianfrilli, P. Piscitelli, A. Lenzi, A. Colao&R. Pivonello, "The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility." *Reprod Toxicol*, c. 73, ss. 105-127, 2017.
- [93] Zavos, P.M., J.R. Correa, C.S. Karagounis, A. Ahparaki, C. Phoroglou, C.L. Hicks&P.N. Zarmakoupis-Zavos, "An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers." *Fertil Steril*, c. 69, sayı(3), ss. 430-4, 1998.

- [94] Yeung, C.H., F. Tuttelmann, M. Bergmann, V. Nordhoff, E. Vorona&T.G. Cooper, "Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication." *Hum Reprod*, c. 24, sayı(6), ss. 1288-95, 2009.
- [95] Zalata, A.A., A.H. Ahmed, S.S. Allamaneni, F.H. Comhaire&A. Agarwal, "Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress." *Asian J Androl*, c. 6, sayı(4), ss. 313-8, 2004.
- [96] Shrivastava, V., H. Marmor, S. Chernyak, M. Goldstein, M. Feliciano&M. Vigodner, "Cigarette smoke affects posttranslational modifications and inhibits capacitation-induced changes in human sperm proteins." *Reprod Toxicol*, c. 43, ss. 125-9, 2014.
- [97] Blanco-Munoz, J., M. Lacasana&C. Aguilar-Garduno, "Effect of current tobacco consumption on the male reproductive hormone profile." *Sci Total Environ*, c. 426, ss. 100-5, 2012.
- [98] Ochedalski, T., A. Lachowicz-Ochedalska, W. Dec&B. Czechowski, "[Examining the effects of tobacco smoking on levels of certain hormones in serum of young men]." *Ginekol Pol*, c. 65, sayı(2), ss. 87-93, 1994.
- [99] Lotti, F., G. Corona, P. Vitale, E. Maseroli, M. Rossi, M.G. Fino&M. Maggi, "Current smoking is associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples." *Hum Reprod*, c. 30, sayı(3), ss. 590-602, 2015.
- [100] Pasqualotto, F.F., B.P. Sobreiro, J. Hallak, E.B. Pasqualotto&A.M. Lucon, "Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men." *BJU Int*, c. 97, sayı(2), ss. 324-6, 2006.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Cansever MEDE

Yabancı Dili : İngilizce

## ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Düzce Üniversitesi	2023
Lisans	Biyoloji	Kocaeli Üniversitesi	2017
Lise	Fen	Mustafa Kemal Lisesi	2013